

UNIVERSIDAD DE OVIEDO

**MÁSTER UNIVERSITARIO EN BIOTECNOLOGÍA
ALIMENTARIA**

**“Empleo de residuos de frutas como fuente
de carbono en el tratamiento de aguas
residuales con hongos”**

TRABAJO FIN DE MÁSTER

POR

Fernando Ceballos-Zúñiga Ulla

Julio, 2019



AGRADECIMIENTOS

A mi tutora, Adriana Laca, por toda la ayuda y orientación siempre que la he necesitado durante esta etapa de formación.

A Ana Isabel Díaz, por todas sus enseñanzas y consejos a lo largo del periodo experimental.

A todos mis compañeros del máster, por esas horas en clase y laboratorio, que gracias a ellos fueron muy amenas.

A mi familia y amigos, por todo el apoyo proporcionado desde la distancia.

INDICE

RESUMEN.....	I
ABSTRACT	II
LISTA DE FIGURAS	III
LISTA DE TABLAS	VI
1. INTRODUCCIÓN	1
2. CONSIDERACIONES TEORICAS	5
2.1 AGUAS RESIDUALES	6
2.1.1 Definición y problemática.....	6
2.1.2. Tratamiento convencional de un agua residual en una (EDAR)	7
2.1.3. Aguas residuales de difícil degradación	8
2.2. TRATAMIENTOS DE BIODEGRADACIÓN CON HONGOS	12
2.2.1. Hongo <i>Phanerochaete chrysosporium</i>	12
2.2.2. Enzimas producidas por el hongo <i>P. chrysosporium</i>	13
2.3. HIDRATOS DE CARBONO	15
2.3.1. Definición y clasificación	15
2.3.2. Residuos agroalimentarios como fuente de carbohidratos.....	16
2.3.3. Residuos procedentes de la uva.....	17
3. MATERIALES Y MÉTODOS	20
3.1. Microorganismo y obtención de inóculo.....	21
3.2. Muestras de aguas residuales y pretratamiento.....	23
3.3. Obtención del zumo de uva	25
3.4. Biotratamiento con hongos	26
3.5. Toma y procesado de muestras	28
3.6. Métodos analíticos.....	28
3.6.1. Determinación de la humedad del hongo.....	28
3.6.2. Medida de carbohidratos totales.....	29
3.6.3. Determinación de la demanda química de oxígeno (DQO).....	30
3.6.4. Determinación de la demanda bioquímica de oxígeno (DBO)	32
3.6.5. Determinación del índice colorimétrico (IC):.....	33
3.6.6. Medida del pH.....	34
3.6.7. Biodegradabilidad.....	34
3.7. Observación de <i>P. chrysosporium</i> al microscopio electrónico de barrido	35
4. RESULTADOS.....	37
4.1. Caracterización de materiales.....	38
4.1.1. Zumo de uva.....	38

4.1.2.	Humedad del hongo	38
4.1.3.	Licor de biometanización.....	39
4.1.4.	Determinación de la DQO inicial del licor negro.....	39
4.2.	Biotratamiento con hongos del licor de biometanización	40
4.2.1.	Ensayo 1	40
4.2.1.1.	Evolución del pH	40
4.2.1.2.	Carbohidratos totales de la muestra	42
4.2.1.3.	Demanda química de oxígeno	43
4.2.1.4.	Demanda bioquímica de oxígeno.....	44
4.2.1.5.	Biodegradabilidad.....	45
4.2.1.6.	Índice colorimétrico.....	46
4.2.2.	Ensayo 2.....	47
4.2.2.1.	Evolución del pH.....	47
4.2.2.2.	Carbohidratos totales.....	48
4.2.2.3.	Demanda química de oxígeno.....	50
4.2.2.4.	Demanda bioquímica de oxígeno.....	52
4.2.2.5.	Biodegradabilidad.....	53
4.2.2.6.	Índice colorimétrico.....	53
4.3.	Biotratamiento con hongos sobre el licor negro	54
4.3.1.	Ensayo 3	54
4.3.1.1.	Medida del pH.....	55
4.3.1.2.	Carbohidratos totales.....	56
4.3.1.3.	Demanda química de oxígeno.....	57
4.3.1.4.	Demanda bioquímica de oxígeno.....	60
4.3.1.5.	Biodegradabilidad.....	61
4.3.1.6.	Índice colorimétrico.....	63
4.4.	Microscopio electrónico de barrido	63
5.	CONCLUSIONES	66
6.	ABREVIATURAS Y SIMBOLOS.....	68
7.	BIBLIOGRAFIA	70

RESUMEN

Las aguas residuales procedentes de la industria presentan gran diversidad de contaminantes en su composición. Algunas de estas aguas contienen contaminantes complejos difícilmente biodegradables, lo que dificulta su tratamiento directo en una EDAR. Se requiere, por lo tanto, un pretratamiento que reduzca sus niveles de contaminantes por debajo de unos valores fijados y/o aumente su biodegradabilidad para un tratamiento posterior. En este grupo de efluentes se encuentra el licor de biometanización, procedente de la digestión anaerobia de residuos, y el licor negro procedente de la industria papelera.

Otro grupo de residuos son los generados por la industria alimentaria, que se encuentran en aumento como consecuencia del incremento de la producción. La gestión adecuada de estos residuos es muy importante, tendiéndose en la actualidad a la búsqueda de alternativas que permitan su valorización.

Por otra parte, estudios recientes investigan el empleo de hongos que forman parte de los microorganismos de la podredumbre blanca presente en la madera para la degradación de contaminantes complejos de aguas residuales de la industria, al ser capaz de liberar enzimas capaces de degradar dichos compuestos.

El estudio que aquí se presenta sigue esta línea de investigación, evaluando la posibilidad de usar el azúcar procedente de residuos de fruta como estimulador de *Phanerochaete chrysosporium*, en el tratamiento de un licor de biometanización y un licor negro.

Los análisis realizados a las muestras tomadas durante los tratamientos muestran que, en el caso del licor de biometanización, cuando el pH se encuentra dentro del intervalo adecuado para *P. chrysosporium* la suplementación con residuo de uva y la inoculación del hongo logran aumentar la velocidad de degradación de contaminantes.

Mientras que en el caso del licor negro de la industria papelera es necesario inocular *P. chrysosporium* para que se produzca degradación de contaminantes, aunque era innecesaria la adición de azúcar.

ABSTRACT

Industrial wastewater contains a great diversity of polluting compounds. Some of these polluting compounds are complex and hardly biodegradable, so they cannot be treated in a conventional wastewater treatment plant. Therefore, this group of effluents needs a previous treatment, in order to reduce the pollutant concentration. Another objective of the previous treatment may be to increase the wastewater biodegradability, which make easier the subsequent treatment. Within of this group of effluents, we can find the biomethanization liquor, from wastes anaerobic digestion, and the black liquor, from the paper industry.

Another group of residues come from the alimentary industry. This industry has been increasing the production and, consequently, the generation of by-products and residues. It is very important to manage properly the generated wastes, and nowadays, investigations are trying to find new applications for residues that allow their valorization. Additionally, recent studies investigate the use of the fungus responsible of white rot on wood in order to degrade the complex polluting compounds in industrial wastewaters. This kind of fungus is able to produce and release some enzymes that degrade these compounds.

This work investigates the possibility of using sugar from grape residues to stimulate *Phanerochaete chrysosporium* in a treatment for black liquor and biomethanization liquor.

The result of this investigation in biomethanization liquor shows that when the pH value is within the optimal range for the activity of *P. chrysosporium*, the supplementation with grape wastes and the inoculation of fungus allow to increase the degradation rate.

In the case of the black liquor, result shows that it is necessary the inoculation of the *P. chrysosporium* to get a great degradation, but it is not necessary to supplement with sugar.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema del proceso de digestión anaerobia.....	10
Figura 2. <i>P. chrysosporium</i> , responsable de la descomposición de la madera.....	13
Figura 3. Escisión del enlace entre el C _α y el C _β de las cadenas laterales de la lignina (Hammel, 1995).....	14
Figura 4. Monómeros que conforman la lignina conocidos como monolignoles.....	14
Figura 5. partes de la uva y compuestos que predominan en cada uno de ellos (Web 2).....	18
Figura 6. Campana de flujo laminar.....	21
Figura 7. Mecanismo para la apertura de una ampolla en cuyo interior se encuentra <i>P. chrysosporium</i> en estado liofilizado.....	22
Figura 8. Matraz de 500 mL en el que se ha obtenido el micelio tras haber añadido 5 cilindros de un cultivo en placa de <i>P. chrysosporium</i> y haber sido incubado a 26°C.....	22
Figura 9. Proceso de obtención de pellets de <i>P. chrysosporium</i> a partir de un cultivo en medio MEA.....	23
Figura 10. Centrifuga usada para el pretratamiento (izquierda) e instrumental necesario para filtración junto con una bomba de vacío (derecha).....	24
Figura 11. Prensa para la extracción del zumo de la uva (izquierda) y las dos fases obtenidas tras el prensado, siendo estas una fase sólida y una fase líquida que es el zumo de uva (derecha).....	25
Figura 12. Zumo de uva centrifugado y filtrado.....	26
Figura 13. Incubador en el que se realiza el crecimiento de <i>P. chrysosporium</i> y el tratamiento experimental. Permite la regulación de las condiciones del ensayo.....	27
Figura 14. Estufa a la que se le ha fijado una temperatura de 105°C.....	29
Figura 15. Espectrofotómetro en el que se ha acoplado un sistema que permite la medición de la absorbancia de la muestra directamente desde un tubo de vidrio.....	30
Figura 16. Patrón de ftalato para el calibrado de DQO (izquierda). Representación gráfica de las absorbancias de las muestras del calibrado frente a su concentración, aportando la ecuación y R ² de la recta (derecha).....	31
Figura 17. Digestores usados para la realización del análisis de DQO.....	31

Figura 18. Aparatos de medida para el análisis de la DBO de una muestra, se encuentran en el interior de una nevera la cual mantiene la temperatura dentro de un rango adecuado.....	33
Figura 19. Espectrofotómetro que permite el análisis de múltiples longitudes de onda sobre una muestra en una cubeta de cuarzo usado para la determinación del Índice Colorimétrico.....	34
Figura 20. Muestras en el soporte tras sufrir un bombardeo con partículas de oro.....	36
Figura 21. Microscopio electrónico de barrido (SEM).....	36
Figura 22. Evolución del pH durante el Ensayo 1 sobre el licor de biometanización (se muestran las medias de los duplicados).....	41
Figura 23. Evolución de la concentración de carbohidratos totales durante el Ensayo 1 sobre el licor de biometanización (se muestran las medias de los duplicados).....	42
Figura 24. Evolución de la demanda química de oxígeno durante el Ensayo 1 sobre el licor de biometanización (se muestran los valores medios de los duplicados).....	43
Figura 25. Valor de la DBO ₅ en el momento inicial y final del Ensayo 1 sobre el licor de biometanización (se muestran los valores medios de los duplicados).....	45
Figura 26. Biodegradabilidad a día 0 y 10 del Ensayo 1 (se muestran los valores medios de los duplicados).....	46
Figura 27. Evolución del Índice colorimétrico durante el Ensayo 1 sobre el licor de biometanización (se muestra la media de los duplicados).....	47
Figura 28. Evolución del pH durante el Ensayo 2 sobre el licor de biometanización (se muestran los valores medios de los duplicados).....	48
Figura 29. Evolución de la concentración de carbohidratos totales durante el Ensayo 2 sobre el licor de biometanización (se muestran los valores medios de los duplicados).....	49
Figura 30. Evolución de la de DQO durante el Ensayo 2 sobre el licor de biometanización (se muestran los valores medios de los duplicados).....	50
Figura 31. Valores de la DBO de los días 0, 4 y 10 del Ensayo 2 sobre el licor de biometanización (se muestran los valores medios de los duplicados).....	52
Figura 32. Comparación entre los valores iniciales y finales de biodegradación en el Ensayo 2 sobre el licor de biometanización (se muestran los valores medios de los duplicados).....	53
Figura 33. Evolución del IC durante el Ensayo 2 sobre el licor de biometanización (se muestran los valores medios de los duplicados).....	54

Figura 34. Evolución del pH durante Ensayo 3 sobre el licor negro (se muestran los valores medios de los duplicados).....	55
Figura 35. Evolución de la concentración de carbohidratos durante el Ensayo 3 sobre el licor negro (se muestran los valores medios de los duplicados).....	56
Figura 36. Evolución de la DQO durante el Ensayo 3 sobre el licor negro (se muestran los valores medios de los duplicados).....	57
Figura 37. Valores de DBO ₅ inicial y final del Ensayo 3 sobre el licor negro (se muestran los valores medios de los duplicados).....	60
Figura 38. Valores iniciales y finales de Biodegradabilidad en el Ensayo 3 sobre el licor negro (se muestran los valores medios de los duplicados).....	61
Figura 39. Evolución del Índice colorimétrico durante Ensayo 3 sobre el licor negro (se muestran los valores medios de los duplicados).....	63
Figura 40. Imágenes de <i>P. chrysosporium</i> en el momento previo al tratamiento, obtenidas gracias al microscopio electrónico de barrido, colocados de menos a más aumentos, de izquierda a derecha, respectivamente.....	64
Figura 41. Imagen de <i>P. chrysosporium</i> a la finalización del tratamiento experimental tomado por el SEM.....	65

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Valor limite que debe tener un vertido en cada uno de los parámetros de análisis según el Anexo IV del Boletín Oficial del Principado.....	7
Tabla 2. Determinación de la humedad de <i>P. chrysosporium</i>	38
Tabla 3. Caracterización del licor de biometanización y comparación con la obtenida en otra publicación (Li et al., 2017).....	39
Tabla 4. Valores de pH, DBO ₅ , DQO y biodegradabilidad medidos del licor negro, obtenidos como paso previo al ensayo, comparándolo con los obtenidos por Pérez-Pérez et al.,2015.....	40
Tabla 5. Porcentajes de degradación de DQO en el Ensayo 1 (respecto a la DQO de las muestras sin suplementar).....	44
Tabla 6. Porcentajes de degradación de los valores de DQO al tercer y décimo día de análisis en el Ensayo 2 (se usó el valor de DQO sin suplementar como muestra inicial).....	51
Tabla 7. Porcentaje de degradación de DQO del Ensayo 3 sobre el licor negro.....	59

1. INTRODUCCIÓN

La industria alimentaria es el sector encargado de la producción de los alimentos y bebidas destinados al consumo humano, siendo una de las más potentes a nivel de producción. En los últimos años, se ha incrementado exponencialmente gracias principalmente a los avances tecnológicos, permitiendo obtener en 2017 en España un volumen real de producción de 89.885 millones de euros (Informe Económico FIAB 2017).

Este incremento de la producción global provoca la formación de residuos derivados del proceso, entre los que se incluyen aquellos alimentos desechados o echados a perder, estimándose que en el mundo ocurre con uno de cada tres productos (Web 7). A este problema se suman otros tales como las emisiones de gases de efecto invernadero y el consumo de recursos materiales.

La tendencia actual para la gestión de estos residuos es sustituir las técnicas que simplemente buscan minimizar el impacto ambiental por otras que permitan su valorización, entre las que destacan el compostaje y la digestión anaerobia. La digestión anaerobia es un tratamiento mediante el que, en ausencia de oxígeno, los microorganismos degradan la materia biodegradable y como producto se obtiene el biogás que puede usarse para la obtención de energía eléctrica y térmica (Timonen et al., 2019). Los residuos alimentarios, bien sean generados en la propia industria o a nivel del consumidor, son muy adecuados para la digestión anaerobia, ya que se tratan en su mayoría de materia orgánica biodegradable. Con el fin de mejorar los rendimientos en el proceso de biometanización, es frecuente realizar una codigestión empleando como material de partida mezclas de distintos tipos de biorresiduos, siendo frecuente la incorporación de lodos procedentes de estaciones depuradoras de aguas residuales urbanas (Web 4 y 5).

Una vez realizada la digestión anaerobia y recuperado el biogás, se obtiene un digestato que suele ser tratado con el fin de separar la fracción sólida, que puede ser utilizada para compostaje, de la fracción líquida (Web 5). Este licor de biometanización no puede ser vertido sin un tratamiento previo, ya que todavía presenta una elevada DQO debida principalmente a la presencia de compuestos complejos que no han podido ser degradados durante el proceso biológico (Web 8).

Las aguas residuales, independientemente de su composición inicial, tras sufrir los tratamientos oportunos deben tener unos niveles de contaminantes por debajo de unos niveles determinados. La legislación vigente es la encargada de marcar los requisitos que

debe cumplir un vertido para cada condición, imponiendo sanciones en el caso de incumplimiento de los mismos (Web 8).

El licor de biometanización requiere por tanto un tratamiento previo a su vertido. Sin embargo, su escasa biodegradabilidad hace difícil su tratamiento en una Estación Depuradora de Aguas Residuales Urbanas convencional donde la materia orgánica disuelta es eliminada mediante tratamiento biológico.

Otro residuo industrial que presenta unas características parecidas al licor de biometanización, en cuanto a su alto contenido en materia orgánica y baja biodegradabilidad, es el licor negro que proviene de la industria encargada de la producción de celulosa (Lauwaert et al., 2019).

En los últimos años, se han desarrollado numerosos estudios que buscan encontrar tratamientos capaces de descomponer compuestos orgánicos complejos, bien por vía fisicoquímica (oxidación) o biológica mediante el empleo de microorganismos específicos o enzimas. Los métodos enzimáticos han permitido obtener buenos resultados a nivel de laboratorio, sin embargo, el escalado a grandes volúmenes todavía es un problema, debido al elevado coste que conllevaría la cantidad de enzima necesaria para lograr una alta eficacia del proceso.

En cuanto al empleo de microorganismos específicos, una alternativa a las bacterias es el empleo de hongos capaces de liberar al medio enzimas que permiten romper las moléculas complejas de difícil degradación en compuestos más sencillos, que puedan ser utilizados por los propios hongos o por las bacterias presentes en un tratamiento posterior.

El estudio presentado a continuación evalúa la posibilidad de empleo del hongo *Phanerochaete chrysosporium*, el cual se haya comúnmente en la corteza de los árboles. Son conocidos como hongos de la podredumbre blanca ya que son capaces de degradar la lignina, que se encuentra en la madera, a dióxido de carbono, gracias a la liberación de enzimas, principalmente lignina peroxidasas y manganeso peroxidasas (Murugesan et al., 2014).

Estudios previos han puesto de manifiesto que, en medios complejos, *P. chrysosporium* actúa mejor tras la suplementa con azúcares como puede ser la glucosa. En este trabajo, se plantea evaluar el empleo de carbohidratos residuales procedentes de la industria agroalimentaria como suplemento para el tratamiento con hongos de aguas residuales con composiciones complejas y difíciles de degradar. El objetivo es doble, por una parte, se busca conocer el potencial de *P. chrysosporium* para el tratamiento de dos efluentes

complejos reales, licor de biometanización y licor negro, y, por otra parte, analizar el posible efecto de adicionar residuos de frutas como fuente de carbono complementaria.

2. CONSIDERACIONES TEORICAS

2.1 AGUAS RESIDUALES

2.1.1 Definición y problemática

La actividad industrial realizada por el ser humano tiene como consecuencia, entre otras, la formación de aguas contaminadas, denominadas aguas residuales. La FAO define a estos efluentes como: ``aguas que no tienen valor inmediato para el fin que se utilizó ni para el propósito para el que se produjo debido a su calidad, cantidad o al momento en que se dispone de ella. No obstante, las aguas residuales de un usuario pueden servir de suministro para otro usuario en otro lugar. Las aguas de refrigeración no se consideran dentro de este grupo``.

Algunas aguas residuales, como las urbanas o las generadas en la industria alimentaria, resultan fáciles de tratar por vía biológica, mientras que otros efluentes de origen industrial se caracterizan por contener compuestos complejos, difícilmente degradables y altamente contaminantes. Un vertido directo al medio ambiente de aguas residuales supondría un gran riesgo al generar perturbaciones que alterasen el orden natural del medio receptor, causando daños entre los que se encuentran los malos olores, la acción tóxica, potencialidad infectiva, modificaciones de la apariencia física y polución térmica, pudiendo desembocar en la pérdida de especies e incluso ecosistemas. Por este motivo, las aguas residuales están fuertemente vigiladas, realizándose diferentes controles que aseguran que nos son devueltas al medio natural hasta cumplir unos niveles de calidad.

La legislación española establece unos valores limitantes para los diferentes parámetros analizados en el efluente final, concretamente, en la Tabla 1 pueden observarse los rangos establecidos para los vertidos al mar autorizados para algunas empresas en el Principado de Asturias. El incumplimiento de estos parámetros conllevaría graves consecuencias, tanto ambientales como económicas.

Tabla 1. Valor límite de cada uno de los parámetros de análisis que debe tener un vertido al mar autorizado para algunas empresas según el Anexo IV del Boletín Oficial del Principado.

Parámetro	Valor límite
pH	6 a 9
Sólidos en suspensión	80 mg/L
Sólidos sedimentables	0,5 mL/L
Demanda bioquímica de oxígeno (DBO)	40 mg O ₂ /L
Demanda química de oxígeno (DQO)	160 mg O ₂ /L
Color inapreciable en disolución	1/20
Aceites y grasas	15 mg/L
Fluoruros (media diaria)	12 mg F/L
Sulfatos	4000 mg SO ₄ /L
Aluminio	1 mg Al/L
Hidrocarburos policíclicos aromáticos	1 mg/L

Así, con el fin de salvaguardar la integridad ambiental y asegurar el cumplimiento de la legislación vigente, la práctica totalidad de las aguas residuales generadas como consecuencia de la actividad humana (con la excepción de las aguas de refrigeración) deben de ser tratadas previamente a su vertido.

2.1.2. Tratamiento convencional de un agua residual en una (EDAR)

Las aguas residuales, dependiendo de sus características, son sometidas a distintos tratamientos en instalaciones conocidas como Estaciones de Depuración de Aguas Residuales (EDAR). La finalidad de estos procesos es la eliminación de aquellas sustancias contaminantes que han sido añadidas al agua durante con el fin de mejorar su calidad hasta cumplir los niveles establecidos. Atendiendo a su naturaleza los tratamientos de las aguas, según Rivas, G. (1978), se pueden clasificar en:

- **Tratamientos físicos:** son los tratamientos más simples y se basan en la eliminación del contaminante gracias a diferencias físicas entre el contaminante y el medio en el que se encuentra. Dentro de este grupo se encuentran el desarenado, la sedimentación, el desbaste, la flotación, etc.

- **Tratamiento químico:** se producen cambios en las propiedades químicas de los contaminantes. Como consecuencia de la reacción se podría lograr destruir el contaminante o convertirlo en una sustancia que se pudiera separar fácilmente. Entre ellos se encuentran la oxidación, la coagulación, la floculación, etc.
- **Tratamiento térmico:** se basa en someter a la muestra a una temperatura elevada afectando a la composición de los contaminantes. Es frecuente con el empleo de oxidantes químicos. Con este tratamiento se consigue que la materia orgánica se descomponga en CO₂ y otros contaminantes se transformen en compuestos más simples.
- **Tratamiento biológico:** el fundamento de este grupo de tratamientos se basa en la utilización de microorganismos que serán adicionados a la muestra a tratar, que actuarán sobre la materia orgánica biodegradable y otros contaminantes presentes en la muestra, degradándolos o convirtiéndolos en sustancias químicas más sencillas. El aumento de biomasa como consecuencia de la elevada concentración de nutrientes permitirá separarlos tras el tratamiento por sedimentación u otro tratamiento físico. Dentro de los tratamientos biológicos se encuentran los fangos activos, los lechos bacterianos, los biodiscos, etc.

Tras el tratamiento de los efluentes industriales en una EDAR, el agua procesada puede ser apta para su vertido, si los parámetros se encuentran por debajo de los valores límites señalados por la legislación vigente. En otros casos, el efluente industrial puede ser vertido a un colector que lo transporte a una estación depuradora de aguas residuales urbanas (EDARU). Sin embargo, no todos los efluentes industriales pueden ser tratados directamente en una EDARU. Estas estaciones de tratamiento son diseñadas para el tratamiento de vertidos con unas determinadas características y aquellos que tienen valores de contaminantes demasiado altos necesitan tratamientos previos antes de ser sometidos a un tratamiento convencional.

2.1.3. Aguas residuales de difícil degradación

Algunas aguas residuales industriales se caracterizan por tener una elevada concentración de compuestos de difícil degradación y/o tóxicos, que hace que no puedan ser directamente tratadas por tratamientos convencionales. Dentro de este grupo de efluentes se encuentran aquellos procedentes de plantas de tratamiento anaerobio de residuos (licor de biometanización) y de la industria papelera (licor negro).

2.1.3.1. Licor de digestión anaerobia o biometanización

La digestión anaerobia o biometanización es un proceso por el que la materia orgánica presente en una muestra es descompuesta por una población heterogénea de microorganismos en ausencia de oxígeno (Campos et al. 2004), obteniéndose como producto de esta reacción una serie de gases entre los que destacan el metano y el CO₂. Esta mezcla de gases es conocida como biogás y a partir de él se puede obtener energía eléctrica y térmica gracias a su elevada capacidad calorífica. El rendimiento del tratamiento y la composición del biogás generado son muy variables y depende principalmente de la composición de los residuos utilizados, siendo los más adecuados aquellos ricos en proteínas, hidratos de carbono y grasas (MITECO, 2019).

En este proceso de digestión anaerobia intervienen distintos grupos de microorganismos que transforman la materia orgánica de la muestra en compuestos más sencillos (Cuadros, 2007/08). La biometanización solo se produce en condiciones de anaerobiosis y es llevada a cabo por bacterias anaerobias estrictas o facultativas.

Las etapas generalmente utilizadas en un proceso de biometanización son las siguientes (FuturEnviro, 2014):

1. Recepción de residuos: la primera etapa en la que se reciben los distintos tipos de residuos debe realizarse en habitáculos cerrados para reducir el impacto oloroso en el ambiente.
2. Pretratamiento: los residuos sufren un cribado en el que se eliminan compuestos de naturaleza no orgánica como envases, metales etc. Al mismo tiempo, se logra acondicionar el material para su digestión.
3. Pretratamiento húmedo: a continuación, se adiciona agua a los residuos al mismo tiempo que se agita, permitiendo que se deshaga la fracción orgánica y así separarla de la fracción inerte. Gracias a una serie de equipos se logra la ruptura de parte de la materia orgánica blanda, aumentando la posibilidad de acceso de los microorganismos.
4. Proceso de biometanización: en esta etapa los residuos humedecidos se alimentan a los digestores. Las condiciones en estos son mesofílicas para favorecer la actuación adecuada de los microorganismos. Aquí la materia orgánica sufre una serie de etapas, destacando el proceso de hidrólisis y de metanogénesis. La mezcla se agita usando parte del biogás producido o por agitación mecánica, garantizando

una agitación adecuada que evite la sedimentación de sólidos y mantenga las condiciones óptimas.

5. Higieneización: esta fase consiste en la elevación de la temperatura de la mezcla hasta valores de en torno a 70°C, los cuales se deben mantener alrededor a una hora. Esto permite reducir el número de microorganismos presentes en la muestra.

Al finalizar el proceso se obtienen dos productos principales, el biogás y el digestato. Este último es habitualmente deshidratado mediante el empleo de centrifugas separando una fracción líquida con muy poco contenido de sólidos y una fracción con alto contenido en sólidos. La fracción solida obtenida en la deshidratación se somete a un acondicionamiento y estabilización aerobia, que permite su transformación en compost. El residuo líquido es tratado en un tamiz y en un decantador, para la eliminación de los sólidos restantes (ver Figura 1).

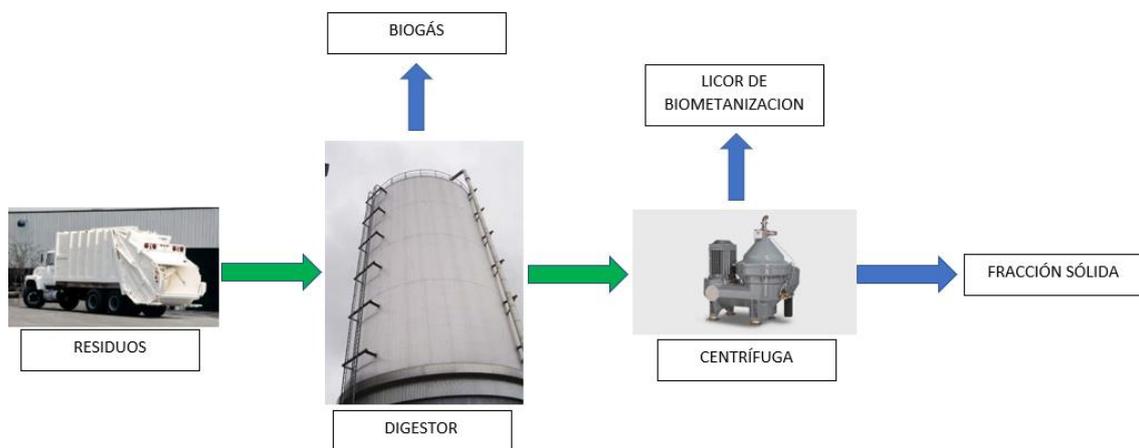


Figura 1. Esquema del proceso de digestión anaerobia.

La fracción líquida resultante es a lo que se conoce como licor de biometanización. Posee generalmente un pH básico, una elevada DQO y compuestos ricos en nitrógeno y fósforo. Este licor de biometanización suele ser tratado junto con otros efluentes en reactores biológicos. Sin embargo, los compuestos orgánicos que contienen suelen ser poco biodegradables con lo que el proceso biológico resulta generalmente poco eficaz, pudiendo incluso resultar perjudicial para el proceso. Resulta por tanto de interés la búsqueda de alternativas para pretratar estas aguas.

2.1.3.2. Licor negro

El licor negro es un efluente generado por la industria de celulosa como subproducto del proceso de *Kraft*, en el que la madera se transforma en pulpa de celulosa tras retirar compuestos presentes como la lignina.

Durante este tratamiento la materia prima (madera) se trata químicamente en una solución, denominada licor blanco. La solución lleva distintos reactivos, como el hidróxido de sodio y el sulfuro de sodio. La mezcla se mantiene en digestores a 120°C durante 1,5 horas, logrando retirar la lignina de la madera. Como resultado del proceso se produce la separación de las fibras de celulosa y la lignina, tras el cual se somete a un lavado (Pola et al., 2019 & Perez-Perez et al. 2015).

Tras el lavado se genera un residuo líquido denominado licor negro, una mezcla compleja que contiene polisacáridos, resinas, sales y, compuestos lignocelulósicos entre otros, que es concentrado por evaporación.

El licor negro se caracteriza por ser peligroso, tóxico, coloreado y escasamente biodegradable. Los valores de pH alcanzan niveles superiores a 12, la cantidad de materia oxidable químicamente es muy elevada, con valores rondando los 130 g de O₂/L. Otro parámetro a tener en cuenta es el color por sus elevados niveles.

Los tratamientos que mejores resultados han dado para el tratamiento de este efluente son los procesos de oxidación avanzada, siendo la reacción Fenton uno de los más estudiados. Otros tratamientos como la oxidación térmica, cloración y ozonización han resultado inefectivas a la hora de reducir la carga orgánica que posee. ^a A pesar de los buenos resultados obtenidos, el coste de las técnicas de oxidación avanzada hace que se estén analizando otras alternativas, creciendo el interés por el empleo de tratamientos biológicos específicos. La complejidad y toxicidad de estas aguas hacen solo algunos microorganismos sean capaces de degradar los contaminantes presentes en ellas (Perez-Perez et al. 2015).

Algunos estudios desarrollados para el tratamiento de aguas residuales complejas se centran en el empleo de hongos tolerantes a medios tóxicos y capaces de liberar enzimas que transformen los contaminantes complejos en compuestos más sencillos concretamente aquellas especies pertenecientes al grupo denominado como hongos de la

podredumbre blanca. Entre estas especies se encuentra *Phanerochaete chrysosporium* (Freitas et al., 2009).

2.2. TRATAMIENTOS DE BIODEGRADACIÓN CON HONGOS

Los hongos son utilizados por multitud de industrias para la producción de sus productos. Se usan para la producción de fármacos, alimentos, pesticidas, etc. Actualmente, se ha producido un incremento del interés por ciertos hongos desarrollándose numerosas investigaciones para analizar su posibilidad de empleo en biorremediación. Estos hongos poseen características especiales que les permitirían actuar sobre compuestos tóxicos, que hasta ahora eran difícilmente procesables por los tratamientos convencionales.

Entre estos hongos estudiados se encuentra *Aspergillus* sp. V1 que se usa para el tratamiento de residuos líquidos producidos por la industria alimentaria (la vinaza), obteniéndose unos niveles de degradación de contaminantes elevados (Del Gobbo et al., 2019).

Entre los más prometedores para el tratamiento de residuos se encuentran los hongos pertenecientes al grupo responsable de producir la podredumbre blanca en la madera. *Trametes versicolor* pertenece a este grupo, y se ha estudiado su posible aplicación para el tratamiento de aguas residuales urbanas, con el fin de eliminar contaminantes como antibióticos, antiinflamatorios y otros medicamentos (Cruz et al., 2017). *Phanerochaete chrysosporium* es otro miembro de este grupo, para el que se ha evaluado su empleo en el tratamiento de residuos líquidos contaminados con hidrocarburos aromáticos policíclicos entre otros (Hammel., 1995). Además, se ha investigado a este hongo para el tratamiento sobre algunos efluentes complejos (Díaz et al. 2018)

2.2.1. Hongo *Phanerochaete chrysosporium*

Es un microorganismo que pertenece al reino de los hongos, la división de los basidiomicetos y dentro de este, a la familia *phanerochaetacea*. Forman parte de un grupo de microorganismos denominados como hongos de la podredumbre blanca, ya que se encuentran en la madera obteniendo energía gracias a la degradación de sus componentes (Barraco-Vega et al., 2017).



Figura 2. *P. chrysosporium*, responsable de la descomposición de la madera.

Poseen filamentos, conocidos como hifas, que pueden estar o no ramificados, los cuales interaccionan conformando el micelio. El tipo de hifas presentes en *P. chrysosporium* son denominadas como generativas, distribuidas en un sistema monomítico. Sus paredes son delgadas, ramificadas y septadas. Además, posee esporas que son formas de resistencia que permiten a aquellos microorganismos que las poseen sobrevivir en condiciones adversas, manteniéndose en un estado de latencia. Las características varían de unas especies a otras. En *P. chrysosporium* poseen una pared delgada y presentan distintas variedades estructurales, encontrándose desde formas cilíndricas hasta elipsoidales.

2.2.2. Enzimas producidas por el hongo *P. chrysosporium*

Su genoma lo componen 30 millones de pares de bases agrupados en 10 cromosomas lineales, con un 56,75 % de guanina-citosina (Martínez et al, 2004). Dicho genoma codifica para una serie de enzimas hidrolíticas, oxidasas y peroxidasas las cuales pueden ser secretadas al exterior celular (Fernández-González et al. 2018). Dentro de este grupo de enzimas se encuentran la lignina peroxidasa (LiP) y la peroxidasa dependiente de manganeso (MnP).

➤ Lignina peroxidasas:

Entre sus funciones se encuentra la de escisión de los dímeros de modelos de ligninas no fenólicas entre el C_α y el C_β de sus cadenas laterales, produciendo alcoholes bencílicos y aldehídos. Además, catalizan la oxidación de ciertos contaminantes aromáticos como los hidrocarburos aromáticos policíclicos (Hammel, 1995).

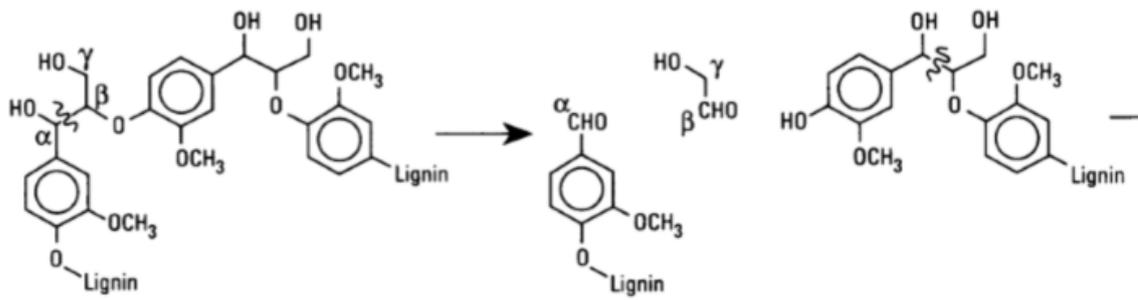


Figura 3. Escisión del enlace entre el C_{α} y el C_{β} de las cadenas laterales de la lignina (Hammel, 1995).

La lignina es un polímero macromolecular, aromático, no lineal, insoluble en agua, presente en las plantas, formando parte de la pared de las células vegetales. Son moléculas complejas muy abundantes, solo viéndose superadas por la celulosa. Está constituida por monómeros diversos, poco reactivos y unidos a partir de enlaces diferentes conocidos como monolignoles lo que le confiere una gran resistencia y dureza, provocando que pocas enzimas sean capaces de reconocerla y degradarla adecuadamente.

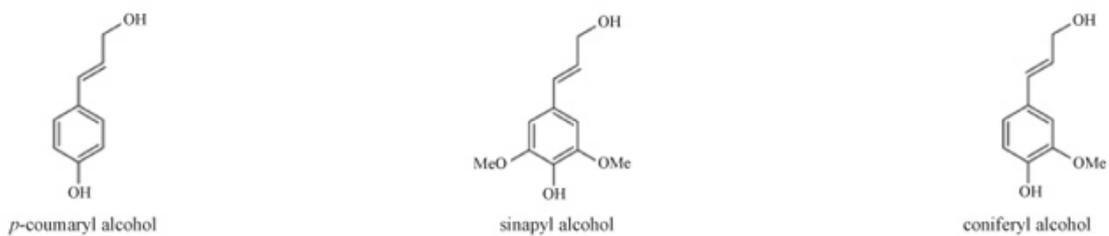


Figura 4. Monómeros que conforman la lignina conocidos como monolignoles.

El proceso por el que es descompuesta la lignina se conoce como lignolisis. Forma parte del metabolismo secundario de *P. chrysosporium* y solo se produce cuando hay condiciones limitantes de algún nutriente, generalmente el nitrógeno. Es necesariamente extracelular debido a las características de este compuesto. Las enzimas encargadas de este proceso actúan como catalizadores degradando la lignina presente en la madera. Producen una serie de radicales libres, inespecíficos, pero altamente reactivos que

interaccionan con la lignina provocando reacciones de escisión espontáneas (Martínez et al., 2004)

➤ Manganese peroxidasa:

Enzima que cataliza la reacción de oxidación del fenantreno para obtener ácido difénico, en presencia de Mn^{2+} , oxígeno y ácidos grasos insaturados mediante una reacción lenta (Hammel, 1995).

Estas enzimas generadas por *P. chrysosporium* degradan diferentes compuestos tóxicos destacando clorofenoles, cloroanilinas, pesticidas (como DDT y metoxicloro) e hidrocarburos aromáticos policíclicos, contaminantes tóxicos orgánicos, además de absorber metales pesados, presentes en aguas (Zhang et al., 2018).

Se trata de un hongo sobre el que se ha mostrado mucho interés en biorremediación. Hay diversos estudios que evalúan la posibilidad de su empleo para tratar aguas residuales de la industria. Entre los licores analizados se encuentra la vinaza, para la que posee un porcentaje de degradación de DQO de un 33,9%. También se ha investigado el tratamiento del licor negro con *P. chrysosporium*, obteniéndose buenos resultados, siendo en estos, el porcentaje de degradación de DQO de 36,8% (Pérez-Pérez et al., 2015).

Estudios previos no publicados aún, sobre el empleo de *P. chrysosporium* en el tratamiento del licor de bimetanización, muestran que la actividad del hongo es mejor cuando el medio es suplementado con azúcares fácilmente asimilables como la glucosa. Esto se debe a la estimulación del hongo, que aumenta su biomasa y libera una serie de enzimas, consiguiendo así un mayor porcentaje de degradación.

Las condiciones óptimas para la actividad de *P. chrysosporium* sobre un medio son: un pH entre 4 y 6, 30°C de temperatura y altas concentraciones de oxígeno (Hailei et al. 2013).

2.3. HIDRATOS DE CARBONO

2.3.1. Definición y clasificación

Los hidratos de carbono o carbohidratos son una serie de nutrientes básicos e indispensables en una dieta, cuyas funciones principales son energética y estructural.

Existen diversos tipos de carbohidratos (Web 1):

- Monosacáridos: son los más simples ya que no pueden ser hidrolizados a un carbohidrato menor, entre los que se puede destacar la glucosa y la fructosa. En función del número de átomos de carbono existen triosas, tetrosas, pentosas, hexosas y heptosas.
- Disacáridos: aquellos que están formados por la unión de dos monosacáridos por enlace covalente conocido como enlace o-glucosídico. Entre los más conocidos se encuentra la lactosa formada por una molécula de glucosa y una de galactosa. Otros disacáridos son sacarosa, maltosa y celobiosa.
- Oligosacáridos: lo componen aquellas moléculas formadas por la unión de 2 a 9 monosacáridos. En la mayoría de los casos se encuentran unidos a proteínas, denominándose glucoproteínas.
- Polisacáridos: cadenas de 10 o más monosacáridos que pueden estar o no ramificados. Con función energética destacan el almidón compuesto por amilosa y amilopectina, presente principalmente en plantas, y el glucógeno que se encuentra principalmente en animales. Con función estructural destacan la celulosa y la quitina, el primero formando parte de la pared celular de las células vegetales mientras que el segundo se encuentra en el exoesqueleto de los artrópodos y en algunos hongos.

La búsqueda de fuentes de nutricionales alternativas a los reactivos puros comerciales está generando gran interés en la sociedad actual. En esta línea, una de las opciones es utilizar los residuos procedentes de la industria alimentaria como fuente de suplemento debido a su riqueza en carbohidratos. De este modo, se hace frente a dos problemas, la escasez de nutrientes en los efluentes de difícil biodegradabilidad y la valorización de residuos agroalimentarios dando lugar a un producto de valor añadido.

2.3.2. Residuos agroalimentarios como fuente de carbohidratos

La industria alimentaria es aquella formada por un conjunto de sectores de producción, que se encargan de los procesos relacionados con la cadena alimentaria. Los más destacados son la industria cárnica, pesquera, agropecuaria, láctea, de bebidas alcohólicas, azucarera, de frutas y hortalizas, etc.

Los alimentos forman parte del grupo de necesidades básicas de los seres humanos, por lo que deben ser de calidad, cubrir las necesidades, ser variados, seguros y accesibles. Con el aumento de la esperanza de vida se ha producido un aumento de la población incrementándose la demanda por lo que fue necesario aumentar la producción y así cubrir las necesidades. Como consecuencia directa del aumento de la producción se produce el incremento de la generación de residuos.

Los residuos de la industria alimentaria son subproductos no deseados o no aptos para la alimentación humana que incluyen los desechos producidos durante el proceso de producción, los generados tras el consumo de los alimentos y aquellos echados a perder. En Europa casi un tercio de los alimentos producidos se desperdician (Web 3). Como consecuencia, el volumen de residuos generados por la industria alimentaria es muy elevado.

Como pasa con aquellos residuos procedentes de otros orígenes, si no son tratados podrían afectar negativamente al medio natural. Uno de los problemas medioambientales más graves que estos residuos podrían generar sería la contaminación de las aguas al tener una elevada carga orgánica.

Los tratamientos para los residuos de la industria alimentaria más utilizados actualmente están encaminados al aprovechamiento de estos, de forma que se obtengan beneficios al mismo tiempo que son tratados. Algunos de los tratamientos que cumplen estas consignas son la biometanización y el compostaje (Cuadros. 2008)

Otra alternativa para los residuos alimentarios sería el empleo de estos como fuente de carbohidratos en el tratamiento de aguas residuales difícilmente degradables. De este modo disminuimos el volumen de residuos generados y fomentamos la bioeconomía circular, usando de un modo sostenible los recursos biológicos para la obtención un producto final de alto valor añadido (Perez-Perez et al. 2015).

2.3.3. Residuos procedentes de la uva

Según la Fundación Española de la Nutrición (FEN), de la vid, arbusto trepador que pertenece la familia de las vitáceas, se obtienen unos frutos en forma de baya redonda, pequeña y jugosa conocido como uva. La estructura de la uva se caracteriza por estar dividida en diferentes partes: la pulpa, las pepitas, la piel u hollejos y el raspón. Hay multitud de variedades de uva, una diferencia entre ellas es el momento de maduración,

el cual va desde agosto- septiembre (mediados de verano) hasta diciembre (principio del invierno).

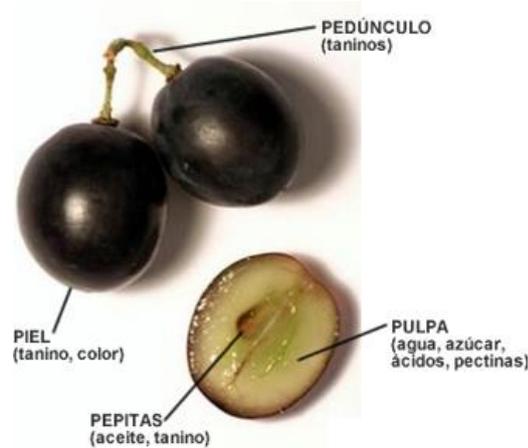


Figura 5. Partes de la uva y compuestos que predominan en cada uno de ellos (Web 2).

Es de gran interés a nivel industrial, ya que puede ser ingerida directamente, o ser procesada obteniéndose productos derivados como el vino. La industria del vino en Europa es uno de los sectores más importantes con una producción de 150 millones de hectolitros. Uno de los países de mayor producción es España la cual es productora de 44 millones de hectolitros. Esta gran producción conlleva la generación de subproductos, alcanzando en España de 2 a 3 millones de toneladas anuales de residuos. Según la Organización Internacional del Vino (OIV) por 100 kg de uva se obtienen 25 kg de residuos, estando compuestos por tallos (25%) y semillas (25%) generalmente. Si estos no son tratados de forma correcta pueden provocar impactos en el medio ambiente. Los residuos pueden ser reciclados, valorizados o dispuestos para evitar la contaminación ambiental. Algunos residuos generados no se utilizan actualmente por su bajo valor económico. El destino de estos residuos es ser procesados por compañías o sistemas públicos ajenos a ellos, llevándolos a depósitos de basura públicos para la gestión de los residuos, abonando la correspondiente tasa a las autoridades competentes. Sin embargo, en la mayoría de las ocasiones, la valorización o reutilización de los residuos generados es más económico que la disposición. Se ha estimado que la valorización y el tratamiento de los residuos de la industria del vino genera beneficios tangibles e intangibles (Ruggieri et al., 2009). Por ello, muchos de los residuos ya se utilizan en otros sectores o para la obtención de diferentes compuestos, destacando el compostaje como uno de los más

comunes. Además de este, se están evaluando numerosas alternativas gracias a la composición de los residuos.

La composición de la uva es extensa y rica en azúcares, según la FEN los compuestos generalmente presentes son:

- Hidratos de carbono: se encuentran en una concentración muy elevada, destacan monosacáridos como la glucosa y la fructosa, que pertenecen al grupo de las hexosas. Siendo la glucosa más biodegradable que la fructosa. Además de estos hay otros monosacáridos como la D-galactosa, D-xilosa, L-arabinosa. También presentan disacáridos como la sacarosa (glucosa y fructosa).
- Ácidos orgánicos: que se encuentran principalmente en la pulpa, destacando el ácido tartárico, málico y cítrico. Siendo el primero el más abundante.
- Alcoholes
- Sustancias nitrogenadas: inorgánicas como es el caso del catión amonio y orgánicas como es el presente en los aminoácidos.
- Enzimas
- Vitaminas: C y B
- Sustancias minerales
- Sustancias pépticas
- Compuestos aromáticos
- Compuestos fenólicos: como son los flavonoides, importantes en la pigmentación.

Entre los compuestos de mayor importancia en la uva se encuentran los compuestos fenólicos que dependen de la variedad de uva y de las condiciones de vinificación. Como tratamiento alternativo para la gestión de residuos de la industria del vino se encuentra su empleo para la extracción de polifenoles, debido a la creciente demanda del empleo de antioxidantes naturales en sustitución de aquellos sintetizados químicamente (Lafka et al., 2007).

Otra alternativa, es el empleo de la vinaza y otros residuos de la uva para la obtención de ácido láctico, tartárico y otros muchos compuestos los cuales tienen un importante potencial de aplicación en otros sectores de la industria alimentaria (Devesa-Rey et al., 2011).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.6. Microorganismo y obtención de inóculo

El hongo utilizado para los ensayos es *Phanerochaete chrysosporium* Burdsall 1974, siendo la cepa empleada CECT 2798, el cual se conserva en estado liofilizado en ampollas en oscuridad y a 4°C en nevera.



Figura 6. Campana de flujo laminar.

La obtención de los pellets a partir de los liofilizados conlleva una serie de pasos que se describen a continuación, debiéndose llevar a cabo en una campana de flujo laminar en condiciones asépticas:

- 1° Recuperación del cultivo liofilizado: se calienta la ampolla de 5 a 15 segundos con una llama, con cuidado de que el foco de calor no incida directamente sobre la zona en la que se encuentra el microorganismo para no dañarlo. Entonces se le adiciona agua estéril gota a gota, lo que provoca el resquebrajado del vidrio. Se retiran los fragmentos que se hayan producido al romperse el vidrio de la ampolla y el algodón con unas pinzas esterilizadas. Abierta la ampolla se realiza la resuspensión del liófilo, para ello con una pipeta Pasteur se añaden 0,3 ml de medio estéril de extracto de malta (ME), se debe resuspender cuidadosamente aspirando y expulsando evitando la formación de burbujas de aire y se deja entre 20 y 30 minutos para la hidratación completa del liófilo. Una vez rehidratado al se inoculan 100 μ L de la suspensión obtenida en un tubo con 10 ml de medio ME y se realizan una serie de diluciones seriadas, se siembran en una placa de medio de extracto de malta con agar (MEA) y se incuba a 26°C una semana. Una vez ha pasado el periodo de incubación se conserva a 4°C.

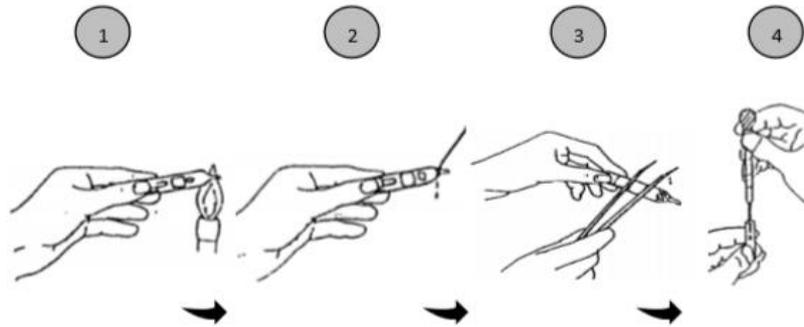


Figura 7. Mecanismo para la apertura de una ampolla en cuyo interior se encuentra *P. chrysosporium* en estado liofilizado.

- 2º Obtención del micelio: Se preparan 150 ml de medio ME en un matraz de 500 ml, ajustándose el pH entre 4,5 y 5,5 en caso de ser necesario y se esteriliza en autoclave a 121°C durante 30 minutos. De la región de crecimiento activo (región externa de la placa Petri) de la placa, obtenida en el paso anterior, se extraen, con un sacabocados, 5 cilindros de 1 cm de diámetro. El matraz se deja incubando a 26°C y 135 rpm durante 6-7 días durante los que se produce el crecimiento del microorganismo. Pasado este tiempo se separa el sólido del líquido, con la ayuda de un colador esterilizado. Se resuspende el sólido en una solución de NaCl al 0,8% en una relación de 1:3 (p/v) y se homogeniza obteniéndose suspensión micelial que se conserva a 4°C.

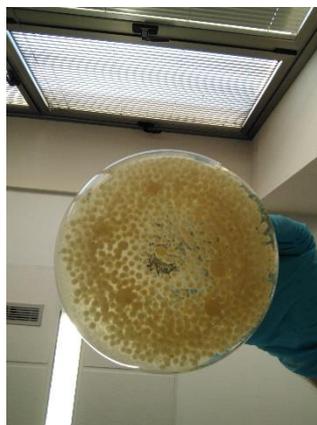


Figura 8. Matraz de 500 ml en el que se ha obtenido el micelio tras haber añadido 5 cilindros de un cultivo en placa de *P. chrysosporium* y haber sido incubado a 26°C.

- 3° Formación de pellets de *P. chrysosporium*. Se preparan 250 mL de medio ME que se introducen en un matraz de 1 L (el pH entre 4,5 y 5,5) y se somete a una esterilización a 121°C durante 30 minutos. Al medio esterilizado y frío se le añaden 600 µL de la suspensión micelial, dejando los matraces inoculados incubando a 26°C y 135 rpm durante 6 días. Pasado este tiempo se realiza el trasvase de los hongos del medio ME a una solución estéril de NaCl al 0,8%. Este paso se realiza en la campana de flujo laminar, filtrando el medio para recuperar los pellets del hongo que se resuspenden en la solución salina y se conserva a 4°C.

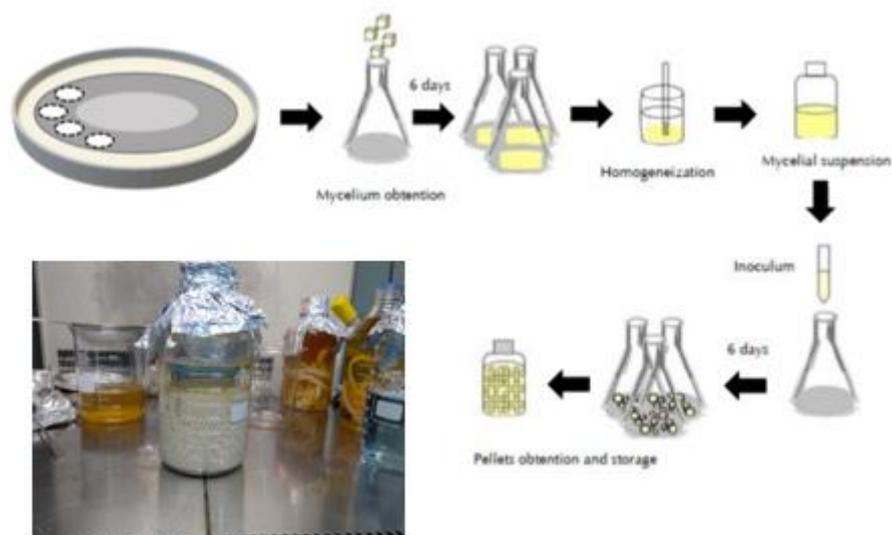


Figura 9. Proceso de obtención de pellets de *P. chrysosporium* a partir de un cultivo en medio MEA (Díaz et al. 2018).

3.2. Muestras de aguas residuales y pretratamiento

En los ensayos se emplean dos tipos de muestras de agua residual, una procedente de residuos de biometanización y la otra de la industria de producción de celulosa. Estas muestras requieren un pretratamiento previo al ensayo.

En el caso del licor de biometanización, es un agua residual suministrada por Cogersa, procedente de la codigestión anaerobia de lodos de la EDAR y la fracción orgánica de residuos municipales. Antes de someterse al tratamiento el agua debe ser preparada, ya que, a pesar de proceder de un proceso de centrifugación contiene una elevada cantidad de sólidos los cuales deben ser eliminados para evitar interferencias en el tratamiento.

El residuo de biometanización no ha sido esterilizado, por lo que en su composición hay presente numerosos microorganismos y enzimas. Por este motivo se almacena en nevera a 4°C con el fin de evitar la posible actividad microbiana.

Para iniciar el pretratamiento, la muestra se trasvasa a unos recipientes equilibrados aptos para una centrifuga y se centrifugan 30 minutos, a 10.000 revoluciones por minuto (rpm), siendo la temperatura de centrifugación la ambiental. Al finalizar se obtienen dos fases, una sólida o sedimento y otra líquida o sobrenadante, siendo recuperada esta última, mientras que el sedimento es desechado. Se realiza una segunda centrifugación con las mismas condiciones. Tras esta, se recupera el sobrenadante que se somete a un filtrado en filtros de 20-25 µm, para eliminar cualquier partícula de tamaño superior al del poro. El agua centrifugada y filtrada, sin solidos se conserva en frio, a 4°C hasta el momento en el que se inicie el tratamiento.

En algunos ensayos el licor ha sido tamponado mediante la adición de un tampón citrato-fosfato.



Figura 10. Centrifuga usada para el pretratamiento (izquierda) e instrumental necesario para filtración junto con una bomba de vacío (derecha).

La segunda muestra a tratar es licor negro suministrado por ENCE, generado como residuo del proceso de fabricación de pasta de papel. Estas muestras poseen una concentración inicial de DQO muy elevada (>100 mg/L), por lo que requiere, una dilución inicial antes de ser sometida al tratamiento con los hongos.

Se realiza un análisis de DQO de la muestra para saber la concentración del licor original y así encontrar la dilución adecuada. En el caso de la muestra de análisis se dedujo que la

dilución que se debería usar sería 1 ml de muestra por cada 25 mL de agua destilada. Para realizar la dilución se usó agua destilada esterilizada.

3.3. Obtención del zumo de uva

Para la suplementación de las muestras con azúcar se usaron residuos de frutas, concretamente residuos de uva.

Se usaron uvas tintas procedente de un supermercado común (residuos de la venta de fruta). Para extraer el zumo, el tratamiento de la uva se inicia con un prensado, este permite obtener cierta cantidad de zumo, pero con el fin de sacar un mayor rendimiento a la uva, adicionalmente se someten a un batido. El producto de esta etapa se separa en un colador obteniéndose una fase líquida y otra sólida.



Figura 11. Prensa para la extracción del zumo de la uva (izquierda) y las dos fases obtenidas tras el prensado, siendo estas una fase sólida y una fase líquida que es el zumo de uva (derecha).

Se mezclan los líquidos obtenidos del prensado y del batido de la uva, se trasvasan a recipientes de centrifugación y se somete a una centrifugación a 10.000 rpm, a 18°C durante 35 minutos con el fin de eliminar los restos sólidos del líquido que no se hayan separado con el colador.

Acabada la centrifugación se separa el sobrenadante y el sedimento, conservándose el sobrenadante que se somete a una filtración con un tamaño de poro de 20-25 μm , para la eliminación de los restos sólidos que no se hubiesen retirado en la centrifugación, obteniéndose así un líquido libre de sólidos y listo para adicionar en el tratamiento.



Figura 12. Zumo de uva centrifugado y filtrado.

Una vez obtenido el zumo de uva sin sólidos, se procede a la determinación de la concentración de carbohidratos totales presentes. Para ello se procede con el método fenol-sulfúrico.

3.4. Biotratamiento con hongos

Se ha ensayado el tratamiento con hongos de las muestras descritas en el apartado 3.2. Con el fin de poder analizar el efecto de los hongos y de la adición de zumo de uva como suplemento se han realizado varios controles en cada ensayo tal y como se describe a continuación:

- Experimento con agua residual suplementada con zumo de uva e inoculada con hongo (M).
- Control con agua residual suplementada con zumo de uva sin hongo (C1).
- Control con agua residual sin suplementar con azúcar, pero inoculado con hongo (C2).
- Control con agua residual suplementada con glucosa pura e inoculado con hongo (C3).
- Control con agua residual, sin suplementación ni inoculación (B).

La glucosa se añade en una concentración de 3 g/L. El zumo de uva se añade en una cantidad tal que, la concentración del azúcar añadido también sea aproximadamente 3 g/L. El hongo se inocula en una proporción de 3 g/L en peso seco.

De cada una de las muestras así preparadas se añaden 250 mL en cada matraz de 1.000 mL, en los que se realiza el tratamiento. El volumen escogido se decidió para mantener una relación oxígeno/muestra adecuada. Todos los experimentos se realizan al menos por duplicado.

Se han realizado tres tipos de ensayos, cuyas características específicas se detallan a continuación:

- Ensayo 1. Se analiza el licor de biometanización al que se añade tampón citrato-fosfato con el fin de tratar de regular el pH de la muestra en torno a un valor de 6. En este caso los reactivos a emplear estaban en una concentración de 0,1 M de citrato y 0,2 M de fosfato. La proporción añadida será de 0,5 L de tampón por cada 2 L de agua residual.
- Ensayo 2. Licor de biometanización sin adición de tampón. El pH inicial de la muestra se ajustó entre 5 y 6 empleando HCl 10 normal. El pH se regulaba diariamente mediante la adición de HCl 1 normal con el fin de mantenerlo en el pH indicado.
- Ensayo 3. Licor negro diluido 1/25. El método de regulación de pH empleado en este ensayo fue el mismo que el descrito para el Ensayo 2.

Una vez se han preparado las diferentes muestras a tratar y se encuentran en matraces de 250 mL, estos son colocados en un incubador. Las condiciones del tratamiento fueron a una temperatura de 26°C y con una agitación de 135 rpm que se mantuvieron los 10 días de duración del ensayo.



Figura 13. Incubador en el que se realiza el crecimiento de *P. chrysosporium* y el tratamiento experimental. Permite la regulación de las condiciones del ensayo.

3.5. Toma y procesado de muestras

Cada uno de los días del ensayo (excepto fin de semanas) se toma un volumen determinado de muestra de cada matraz.

Cada día se tomaron 6 ml de muestra de cada matraz, salvo aquellos días que en los que se realizó análisis de DBO₅, siendo estos el día de inicio, 4 y 10 del tratamiento. En estos casos se retiraron entre 30 y 60 mL.

El procesado de las muestras se realizaba inmediatamente tras la toma. El volumen de muestra se lleva a tubos aptos para centrifugas donde se someten a una centrifugación a 10.000 g durante 15 minutos, a 18°C de temperatura. El sobrenadante se trasvasó a tubos estériles que se mantuvieron congelados hasta el momento del análisis.

3.6. Métodos analíticos

3.6.1. Determinación de la humedad del hongo

Es necesario conocer el contenido de humedad del hongo suplementado con el fin de inocular siempre la misma cantidad de hongo en peso seco en los tratamientos. Se tienen que realizar una serie de pasos que se describen a continuación:

El análisis de la humedad hongo se hizo por triplicado. Se necesitan morteros numerados a los que se les añade arena de mar lavada de grano grueso. Se lleva a la estufa y se deja 1 hora a 105°C para eliminar toda la humedad que pudiese tener el material, a continuación, se deja enfriar y se pesa el mortero con la arena. Entonces se tara la balanza con el mortero y la arena, se añade cierta cantidad de hongo y se anota la medida de la balanza que se corresponderá con la cantidad de hongo húmedo añadido. Se deja en la estufa a 105°C 1 día. Al día siguiente se ponen los morteros en un desecador durante 15 minutos para dejarlo enfriar y se vuelve a pesar. El peso de hongo húmedo menos el peso del hongo seco se corresponde con la cantidad de agua evaporada. Comparando el valor del agua evaporada y el peso del hongo húmedo se obtiene el porcentaje de humedad del hongo.



Figura 14. Estufa a la que se le ha fijado una temperatura de 105°C

3.6.2. Medida de carbohidratos totales

Para determinar los carbohidratos totales se empleó el método fenol-sulfúrico. Se basa en la adición de ácido sulfúrico concentrado a un volumen de muestra, lo que provoca la deshidratación de los carbohidratos presentes produciendo compuestos derivados de furfural que, al añadir el fenol, reaccionan con este produciendo un color detectable en un espectrofotómetro.

El primer paso es la preparación de un calibrado, en el que se añadirán concentraciones conocidas de glucosa de 0 a 100 partes por millón o ppm (mg/L). Para el blanco se usó agua destilada, a las que se les asociará un valor de señal en el espectrofotómetro. Esto permitirá tener una recta cuya ecuación se podrá usar para la determinación de la concentración de las muestras.

La muestra para tratar tenía una concentración de carbohidratos totales muy elevada, quedando fuera del intervalo del calibrado, por ello como paso previo se tuvo que realizar una dilución de la muestra. Se determinó que diluyendo la muestra 50 veces (1:50) se obtenía una señal adecuada. Se hicieron triplicados de cada análisis.

La forma de proceder fue la siguiente:

Se toma 1 mL de la muestra diluida a la que le añadimos 0,5 mL de fenol al 5%, a esta mezcla se le añaden 2,5 mL de ácido sulfúrico concentrado al 96%. Se agita con el vórtex para la mezcla de los componentes y la correcta reacción. Se deja enfriar sobre 15 minutos y se mide la absorbancia en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 492 nm.



Figura 15. Espectrofotómetro en el que se ha acoplado un sistema que permite la medición de la absorbancia de la muestra directamente desde un tubo de vidrio.

Una vez se obtienen los datos de absorbancia, con la ayuda de la ecuación obtenida con el calibrado, se calcula la concentración de carbohidratos presente en la muestra. Las unidades dependerán de las usadas a la hora de hacer el calibrado. En el caso de este ensayo fueron ppm.

3.6.3. Determinación de la demanda química de oxígeno (DQO)

Permite medir el contenido en materia orgánica de una muestra líquida mediante la actuación de un oxidante químico fuerte, el dicromato potásico, que en presencia de materia orgánica se reduce a Cr (III) de color verde. La cantidad de Cr (III) es proporcional a la cantidad de materia orgánica y su concentración puede determinarse por espectrofotometría.

Para realizar el análisis se necesitan dos soluciones, la disolución A se forma a partir de sulfato de plata que quedará a una concentración de 6,6 g/L tras ser diluido con ácido sulfúrico al 96%. La disolución B (dicromato potásico) se forma a partir de una mezcla de varios reactivos. Para preparar 2 L se necesitan 57,8 mL de sulfato de plata (60 g/L), 1481,5 mL dicromato potásico 0,25 N, 155,6 mL sulfato de mercurio (200 g/L) y 305,9 mL ácido sulfúrico al 95%.

El calibrado de este análisis se realiza empleando como patrón ftalato y ácido de potasio. A 3 mL de la muestra patrón se le añaden 4 mL de la disolución A y 2 mL de la B. Se mezcla y se mantiene en el digestor a 150°C durante 2 horas. A continuación, se deja enfriar durante media hora y se mide la absorbancia a 600 nm. Cada concentración se

asocia a una absorbancia, se realiza una representación gráfica y se obtiene una recta de calibrado de la que obtendremos una ecuación que nos permitirá determinar la concentración para las distintas absorbancias obtenidas en los análisis de muestras.

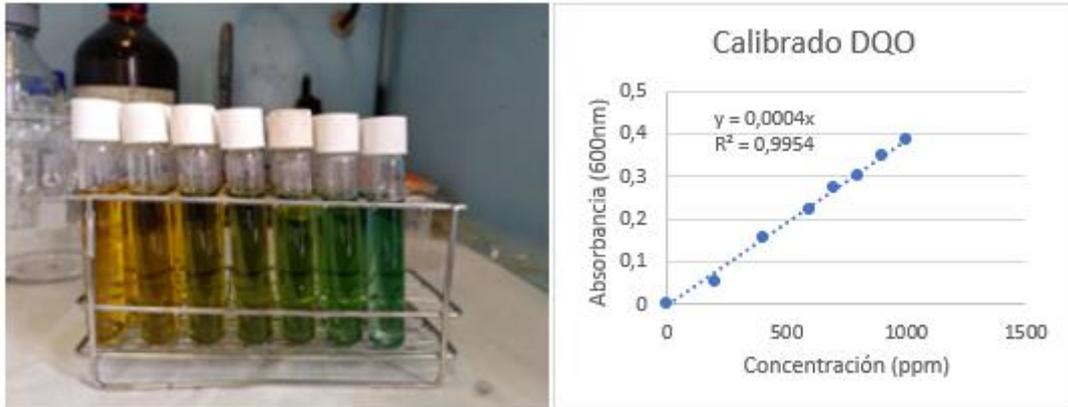


Figura 16. Patrón de ftalato para el calibrado de DQO (izquierda). Representación gráfica de las absorbancias de las muestras del calibrado frente a su concentración, aportando la ecuación y R^2 de la recta (derecha).

Las muestras se diluyen adecuadamente para su análisis con el fin de que la concentración medida se encuentre dentro del intervalo calibrado. Se añaden 3 mL de esta dilución en un tubo de digestión y posteriormente se procede con el mismo protocolo que el utilizado para realizar el calibrado. Con las absorbancias que se obtienen y la ecuación de la recta de calibrado se determina el valor de DQO de la muestra diluida y a partir de este el valor de la muestra analizada.



Figura 17. Digestores usados para la realización del análisis de DQO.

3.6.4. Determinación de la demanda bioquímica de oxígeno (DBO)

Permite medir el contenido de materia orgánica biodegradable de una muestra líquida. Para ello se mide el oxígeno consumido por los microorganismos para oxidar toda la materia orgánica biodegradable presente en la muestra analizada. El tiempo necesario para que la oxidación sea completa es de 21 a 28 días. Debido a la larga duración de la DBO_{final} , se ha tendido a sustituir por la DBO_5 , que solo mide la materia carbonatada degradada en 5 días, lo que supone en torno a un 65% del total ($DBO_{final} = 1,46 \times DBO_5$). Antes de llevar a cabo el ensayo se debe comprobar que el pH de la muestra se encuentra entre 6,5 y 7, y si fuese necesario ajustar con un ácido o una base. En caso de ser necesario, la muestra será diluida para que la cantidad de materia biodegradable presente en ella quede dentro del rango de análisis del equipo de medida.

El método empleado para realizar la determinación de la DBO_5 ha sido el método de Warburg que se explica a continuación. Se añade el volumen de muestra determinado en una botella de DBO, se introduce un imán en cada una y se añaden unas gotas de inhibidor de la nitrificación, evitando la oxidación de nitritos y sales amoniacales susceptibles de sufrir oxidación, el número de gotas dependerá del rango seleccionado. Posteriormente se añade un inóculo, el cual lo componen microorganismos, la cantidad en este caso osciló de 0,8 a 1 mL. Se coloca la boquilla y en esta se añaden 4 gotas de hidróxido potásico (para fijar el CO_2). Se enrosca el cabezal en la botella sin apretar dejándose en la nevera para que la muestra estabilice a la temperatura de esta, y se dejar durante 30 minutos para que atempere. Pasado este tiempo se aprieta y se introduce en el digestor a $20^\circ C$ sobre una placa de agitación.

A medida que se produce la degradación de la materia orgánica, se consume oxígeno y se produce la bajada de la presión que es registrada por el equipo de DBO. En casos en los que era necesario las muestras eran diluidas empleando agua de dilución. Para el blanco se usa agua de dilución a la cual se le añaden los mismos componentes que al resto de muestras.



Figura 18. Aparatos de medida para el análisis de la DBO de una muestra, se encuentran en el interior de una nevera la cual mantiene la temperatura dentro de un rango adecuado.

3.6.4.1. Preparación del agua de dilución:

Esta se obtiene a partir de agua destilada a la que se le añadirán una serie de reactivos. Se necesitan disoluciones de cloruro férrico, cloruro cálcico, sulfato de magnesio y tampón fosfato. Se añadirá 1 mL de cada disolución por litro de agua destilada añadida.

La mezcla se deja en aireación durante un mínimo de 4 horas, dejándolo reposar a continuación durante 24 horas. Comprobar que en el momento de uso el agua de dilución presenta un pH entre 6,5 y 7.

3.6.5. Determinación del índice colorimétrico (IC):

El color es una característica de las aguas residuales que también debe tenerse en cuenta, ya que forma parte de los requisitos analizados a la hora de comprobar la legalidad de un vertido. El color lo aportan los compuestos que se encuentran en la muestra, por ello en este estudio también se analiza la evolución de este parámetro con el tratamiento.

Para ello, se mide la absorbancia de las muestras a tres longitudes de onda 436, 525 y 620 nm y se aplica la siguiente ecuación:

$$IC = \frac{SAC_{436}^2 + SAC_{525}^2 + SAC_{620}^2}{SAC_{436} + SAC_{525} + SAC_{620}}$$

Donde SAC son los coeficientes de absorbancia espectral, que se obtiene del cociente del valor de absorbancia a una longitud de onda, entre el espesor de la celda o cubeta. Lo normal es que el espesor de la celda sea igual a 1 cm, de forma que $SAC = Abs.$

Como blanco para la medida de la absorbancia se utilizó agua destilada.



Figura 19. Espectrofotómetro que permite el análisis de múltiples longitudes de onda sobre una muestra en una cubeta de cuarzo usado para la determinación del Índice Colorimétrico.

3.6.6. Medida del pH

El pH es un parámetro que indica como de ácida o básica es una sustancia. Se analiza para conocer su variación durante el tratamiento y comprobar si se mantiene dentro del intervalo óptimo para de *P. chrysosporium*.

La medida de pH se realizaba en el momento de toma de muestra.

3.6.7. Biodegradabilidad

Permite saber la proporción de materia orgánica biodegradable con respecto a la cantidad total de esta presente en una muestra en un momento determinado. Así, se puede conocer como de biodegradable es una muestra.

Es un parámetro de interés en el análisis actual, ya que, uno de los objetivos es conocer si *P. chryso sporium* logra aumentar la biodegradabilidad de las aguas analizadas rompiendo compuestos no biodegradables.

Se obtiene con el cociente entre la DBO₅/DQO.

3.7. Observación de *P. chryso sporium* al microscopio electrónico de barrido

La microscopía electrónica de barrido es un tipo de microscopía que usa un haz de electrones en lugar de luz, y a través de esa interacción del electrón con la materia se logra la formación de la imagen.

Se observan al SEM muestras de hongo tomadas los días 0 y 10 del ensayo 3. Para ello se procedió de la siguiente manera:

1. A las muestras se les quita todo el líquido que lleven y se les añaden 20 ml de glutaraldehído (Panreac) al 3% (v/v) en tampón fosfato 0,025 M (VWR) y se deja 1 día para fijar los microorganismos.
2. Para el eliminar el glutaraldehído, se realizan 3 lavados de 15 minutos cada uno con tampón fosfato.
3. Se realizan lavados de 15 minutos con etanol (Panreac) diluido en agua en concentraciones crecientes 20%, 40%, 60%, 80%, 100% y 100% (v/v).
4. Se realizan lavados de 10 minutos con acetona diluida en etanol (Sigma-Aldrich) al 30%, 50%, 70%, 90%, 100% y 100%. Estos lavados con etanol y con acetona se realizaron para la deshidratación de la muestra.
5. Se procede al secado de la muestra con CO₂ supercrítico (Critical Point Dryer Balzers CPD 030, Polaron).
6. Las muestras secas se trasvasaron a unos soportes de aluminio sobre los que se ha colocado una tira de carbón adhesiva por ambas caras.
7. Se introducen los soportes en un evaporador al vacío donde se bombardearán con oro, que recubrirá la muestra y la cara superior del soporte.



Figura 20. Muestras en el soporte tras sufrir un bombardeo con partículas de oro.

8. Se introducen las muestras en el microscopio electrónico de barrido y se seleccionan los parámetros adecuados para su observación.

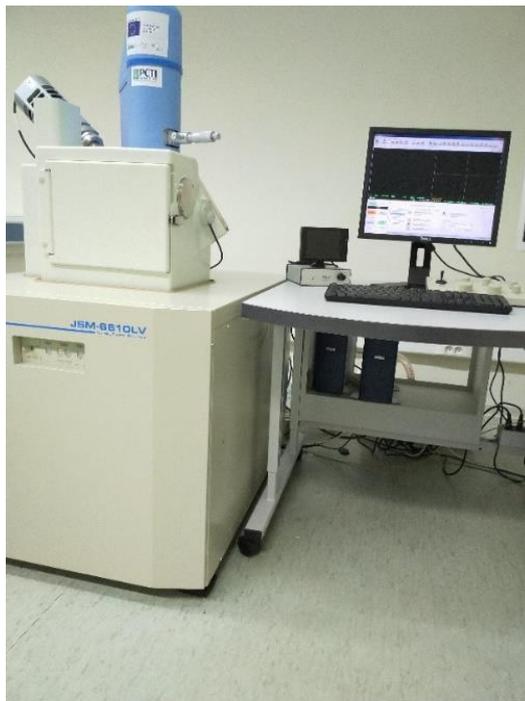


Figura 21. Microscopio electrónico de barrido (SEM)

4. RESULTADOS

4.1. Caracterización de materiales

4.1.1. Zumo de uva.

El zumo de residuos de uva es el suplemento propuesto para suministrar carbohidratos fácilmente asimilables por los hongos de manera que actúen como estimuladores en el proceso de degradación. Se sabe por estudios previos, que algunos residuos líquidos de difícil biodegradabilidad pueden ser tratados con *P. chrysosporium*, con resultados satisfactorios cuando son suplementados con glucosa en una proporción de 3 g/L.

Para añadir la cantidad de azúcar prefijada, es necesario saber la cantidad que posee el zumo de uva, por lo que se procede a su cálculo siguiendo un protocolo experimental. Se obtiene que la concentración de azúcar en el zumo es de 170 mg/L. Con el valor obtenido, se determina la cantidad de zumo a añadir para que la concentración en la muestra sea de 3 g/L, siendo el volumen a añadir de 17,6 mL por cada litro de agua a tratar.

4.1.2. Humedad del hongo

En la Tabla 2, se muestran los resultados de los análisis de humedad realizados al hongo húmedo necesario para utilizar como inóculo.

Tabla 2. Determinación de la humedad de *P. chrysosporium*.

Mortero	Mortero y arena seca	Hongo añadido	Peso seco (tras 1 día a 105°C)	% Humedad
1	68,45	3,18	68,59	95,59%
2	72,2	1,65	72,26	96,36%
3	70,6	2,93	70,72	95,90%

En vista de los resultados obtenidos del análisis de tres muestras, se establece que la humedad del hongo es de 95,96% \pm 0,4. A partir de este dato, se calcula que la cantidad de hongo que se debe añadir a un matraz con 250 mL de agua para que se encuentre a una concentración de 3 g/L en peso seco es de 18,6 gramos.

4.1.3. Licor de biometanización

Se midieron algunos de los parámetros iniciales del licor de biometanización para la caracterización previa al ensayo. En la Tabla 3 se muestran los análisis de la DQO y pH en la muestra, comparándolo con aquellos publicados en otro artículo (Li et al., 2017).

Tabla 3. Caracterización del licor de biometanización y comparación con la obtenida en otra publicación (Li et al., 2017).

Muestra	pH	DQO (mg/L)
Caracterización del licor de biometanización	7,48	4768
Caracterización del licor de biometanización por Li et al., 2017	7,7	2256

4.1.4. Determinación de la DQO inicial del licor negro

El licor negro presenta unos valores de DQO muy elevados. En cuanto a su materia seca, corresponde al 11% en peso. Algunos valores se presentan en la siguiente tabla.

Tabla 4. Valores de pH, DBO₅, DQO y biodegradabilidad medidos del licor negro obtenidos como paso previo al ensayo, comparándolo con los obtenidos por Pérez-Pérez et al.,2015.

Parámetro	Caracterización del licor negro por Pérez-Pérez et al.,2015	Caracterización del licor negro previa al tratamiento
pH	12,5	12,79
DBO ₅ mg O ₂ /L	1.866	16.575
DQO mg /L	110.000	149.166
Biodegradabilidad	0,02	0,11

4.2. Biotratamiento con hongos del licor de biometanización

Como se ha explicado en apartados anteriores, se procedió al tratamiento de un licor de biometanización, procedente de la codigestión anaerobia de lodos de EDAR y la fracción orgánica de residuos municipales.

4.2.1. Ensayo 1

Como ya se ha comentado, en este caso, se intentó mantener el pH dentro de los valores óptimos para *P. chryso sporium* mediante el empleo de una disolución tampón de citrato-fosfato. La cantidad añadida de tampón fue de 0,5 L por cada 2 L de licor, con lo que se produjo una ligera dilución de la muestra a tratar, partiéndose de una DQO de 4258 mg/L. Así mismo, en los matraces suplementados con glucosa o zumo de uva (M, C1 y C3) se partió de una DQO de en torno a 7300 mg/L.

4.2.1.1. Evolución del pH

El rango óptimo de actuación de *P. chryso sporium* según Hailei et al., 2016 es entre 4 y 6, pero por análisis previos se ha comprobado que puede actuar ligeramente por encima de 6. La solución tampón permitió que en todos los casos se partiera de un pH de 6.

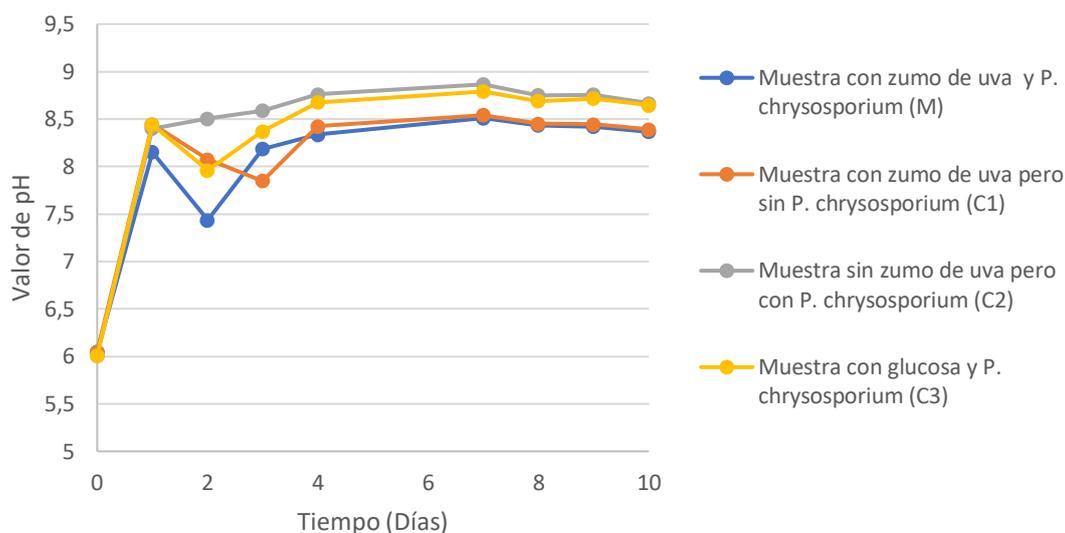


Figura 22. Evolución del pH durante el Ensayo 1 sobre el licor de biometanización (se muestran las medias de los duplicados).

A pesar de que el pH de partida se encontraba dentro del intervalo óptimo de actuación de *P. chrysosporium* el tampón empleado no logró mantener este pH más allá de los primeros días de tratamiento. Así, se observó un incremento exponencial de dicho valor de pH en todas las muestras durante el primer día de tratamiento como consecuencia de la actividad microbiológica alcanzándose valores entre 8 y 8,5. A partir del tercer día, las muestras se dividieron en dos grupos, en función del valor de pH medido. Las muestras M y C1 evolucionaron a lo largo del tratamiento con valores de pH próximos a 8,5. Dentro del segundo grupo se encuentran aquellas muestras que se estabilizaron en valores de pH superiores a 8,5, siendo estas C2 y C3.

La solución tampón que se añadió a las muestras durante su preparación, debería haber mantenido el pH alrededor del valor de partida. Sin embargo, los valores medidos a lo largo del tratamiento mostraron que el tampón no logró su cometido. Como consecuencia, a partir del primer día de tratamiento, el pH de las muestras se encontraba fuera del rango óptimo de actuación del microorganismo (Hailei et al., 2016).

4.2.1.2. Carbohidratos totales de la muestra

Entre los compuestos que componen un licor de biometanización se encuentran los carbohidratos, comúnmente conocidos como azúcares. La evolución de la concentración de estos durante el tratamiento de cada una de las muestras se representa en la Figura 23.

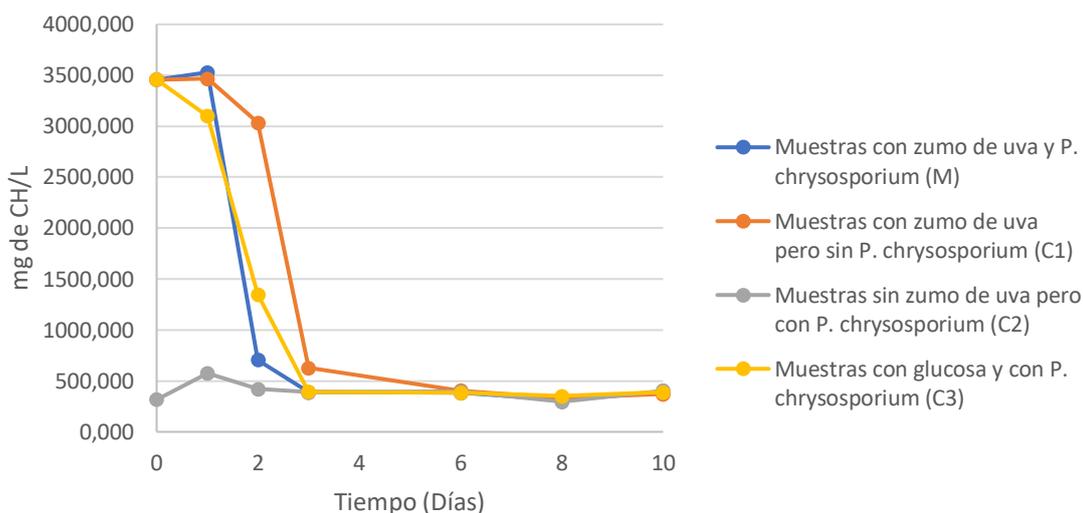


Figura 23. Evolución de la concentración de carbohidratos totales durante el Ensayo 1 sobre el licor de biometanización (se muestran las medias de los duplicados).

En la Figura 23, se observa que la muestra sin suplementar con azúcar (C2) parte de un valor inicial de carbohidratos ligeramente inferior a 500 mg/L, en torno al que se mantiene constante durante todo el tratamiento, sin que se produzca ningún consumo de los mismos por parte del hongo.

En las muestras suplementadas (M, C1 y C3) se parte de una concentración inicial de alrededor de 3.500 mg/L. Durante los primeros días de tratamiento los niveles de carbohidratos disminuyen a gran velocidad. Mientras que las muestras inoculadas con hongo comienzan (M y C3) a degradarse rápidamente a partir del primer día. La muestra que no ha sido inoculada con *P. chrysosporium* (C1) comienza a descender aproximadamente un día más tarde debido a la presencia de microorganismos que se encontraban desde el origen. No se aprecian diferencias entre las suplementadas con glucosa o con zumo de uva.

A partir del 4 día de tratamiento, todas las muestras alcanzan la misma concentración de carbohidratos que se corresponde con el contenido en los mismos de la muestra sin suplementar y que se mantiene constante hasta el final del tratamiento. Se deduce por lo tanto que, los carbohidratos consumidos durante el protocolo experimental son aquellos añadidos como suplemento, sin que los presentes inicialmente en la muestra sean degradados.

4.2.1.3. Demanda química de oxígeno

La cantidad de materia orgánica oxidable de las muestras es un parámetro relevante sobre el que se debe prestar especial atención, ya que lo conforman la materia orgánica biodegradable y aquella no asimilable por los microorganismos. Lo primero a destacar es que la DQO de partida de la muestra sin suplementar es de 4.200 mg/L, aproximadamente 10 veces superior a la concentración de carbohidratos, lo que pone de manifiesto la presencia de gran cantidad de compuestos orgánicos que no son carbohidratos y que posiblemente presentan una elevada complejidad, siendo responsable de la escasa biodegradabilidad de la muestra. La evolución de la DQO se muestra en la Figura 24.

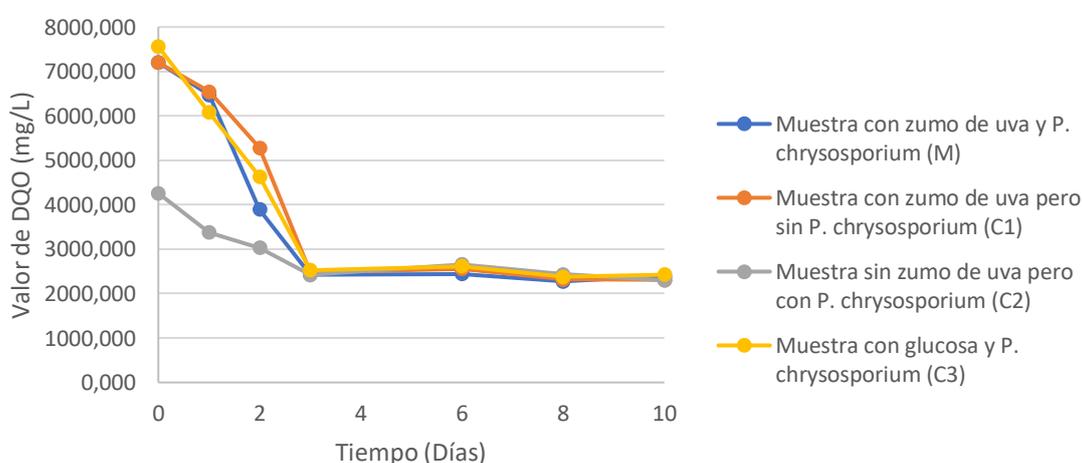


Figura 24. Evolución de la demanda química de oxígeno durante el Ensayo 1 sobre el licor de biometanización (se muestran los valores medios de los duplicados).

Del mismo modo que ocurría con la concentración de carbohidratos totales, la DQO inicial de las muestras suplementadas es ligeramente superior a 7.000 mg/L.

En la muestra de menor DQO inicial (C2), aquella que no fue suplementada. Los microorganismos presentes (Díaz et al., 2018 [1]) junto con *P. chrysosporium*, degradan parte de la DQO hasta que esta se mantiene estable, en torno a un valor ligeramente superior a 2.000 mg/L, variando de forma poco significativa los días restantes del tratamiento.

Las muestras M, C1 y C3, suplementadas con azúcares sufren una disminución en la DQO durante los primeros días de tratamiento, hasta llegar al día 4, a partir del cual, la DQO se mantiene estable durante el resto del tratamiento, en un valor próximo a 2.000 mg/L, similar al alcanzado por las muestras sin suplementar.

A la vista de los resultados, cabe señalar que la presencia de hongo no contribuye a mejorar la degradación del licor, sin observarse diferencias en los resultados finales entre las muestras suplementadas y sin suplementar.

Tabla 5. Porcentajes de degradación de DQO en el Ensayo 1 (respecto a la DQO de las muestras sin suplementar).

Muestra	Porcentaje de degradación de DQO
M	43,84 %
C1	45,79%
C2	46,01%
C3	43,05%

La falta de actividad del hongo se atribuye al hecho de que desde los primeros días el pH de los medios estuvo fuera del intervalo óptimo, pudiendo inhibirse la actividad del hongo. No obstante, se observa una cierta degradación de la DQO inicial de la muestra, que se atribuye principalmente a los microorganismos aerobios o facultativos que estén presentes en el agua inicial.

4.2.1.4. Demanda bioquímica de oxígeno

La DBO es uno de los métodos más usados para la evaluación de la fracción de materia orgánica biodegradable (Jouanneau et al., 2014). La materia biodegradable de cada una de las muestras se analizó en el momento inicial y final del tratamiento. Su evolución se muestra en la Figura 25.

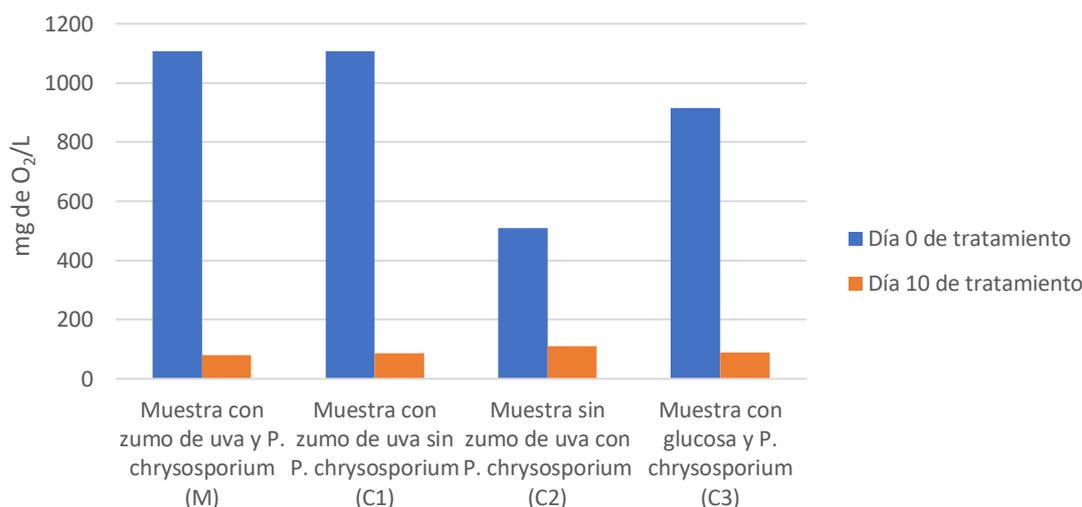


Figura 25. Valor de la DBO₅ en el momento inicial y final del Ensayo 1 sobre el licor de biometanización (se muestran los valores medios de los duplicados).

En el caso de las muestras analizadas en este estudio, como se observa en la Figura 25, la cantidad de materia biodegradable al comienzo del tratamiento fue más elevada que al final del mismo.

Se observa que la ausencia del microorganismo inoculado es indiferente para su reducción de DBO₅, puesto que alcanza valores muy similares a aquellos a los que se les ha inoculado. Se pone de nuevo de manifiesto el hecho de que los cambios observados se deben principalmente a la presencia de microorganismos endógenos. Esta ausencia de actividad del hongo sobre el licor de biometanización puede deberse al incremento del pH superando el rango óptimo de actuación del microorganismo, o bien a que la composición de la muestra sea excesivamente compleja para ser degradada por el hongo. Este resultado es diferente al mostrado por numerosos estudios que usan *P. chrysosporium* como tratamiento para diferentes residuos líquidos, obteniéndose resultados positivos (Behnood et al., 2014).

4.2.1.5. Biodegradabilidad

La biodegradabilidad es un parámetro que se obtiene a partir la relación entre la DBO₅ y la DQO, informando de la relación entre la cantidad de materia biodegradable y la materia orgánica oxidable total, de tal forma que, cuando el valor obtenido es mayor de 0,5, la muestra se considere fácilmente degradable (Meena et al., 2019). En el caso de la muestra

sin suplementar (C2) la biodegradabilidad es de 0,12, lo que indica que se trata de una muestra muy poco biodegradable.

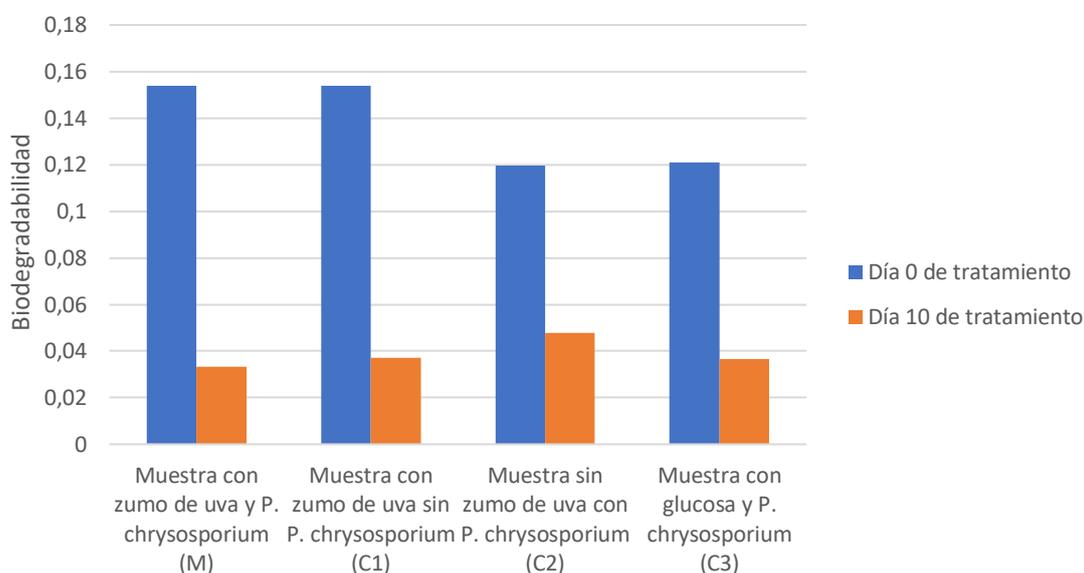


Figura 26. Biodegradabilidad a día 0 y 10 del Ensayo 1 (se muestran los valores medios de los duplicados).

Como puede observarse en la Figura 26, las muestras con mayor biodegradabilidad inicial son aquellas suplementadas con zumo de uva. La biodegradabilidad de las muestras finales tras el tratamiento se ve reducida como consecuencia de la actuación microbiológica sobre la muestra, consumiendo la materia biodegradable.

Todas independientemente de su pretratamiento, al finalizar el ensayo, presentan una biodegradabilidad muy baja, al encontrarse muy por debajo de 0,5. La muestra sin suplementar (C2) presenta un valor ligeramente superior que el resto de las muestras.

Las muestras tratadas, serían por tanto aguas que todavía presentan una DQO elevada (>2.000 mg/L) y que no se adecuan para un tratamiento biológico dado su baja biodegradabilidad (<0,06).

4.2.1.6. Índice colorimétrico

Uno de los análisis realizados es la medida del Índice colorimétrico de las muestras. Este se realiza para comprobar si el tratamiento experimental afecta al color de la muestra. La evolución de este se muestra en la Figura 27.

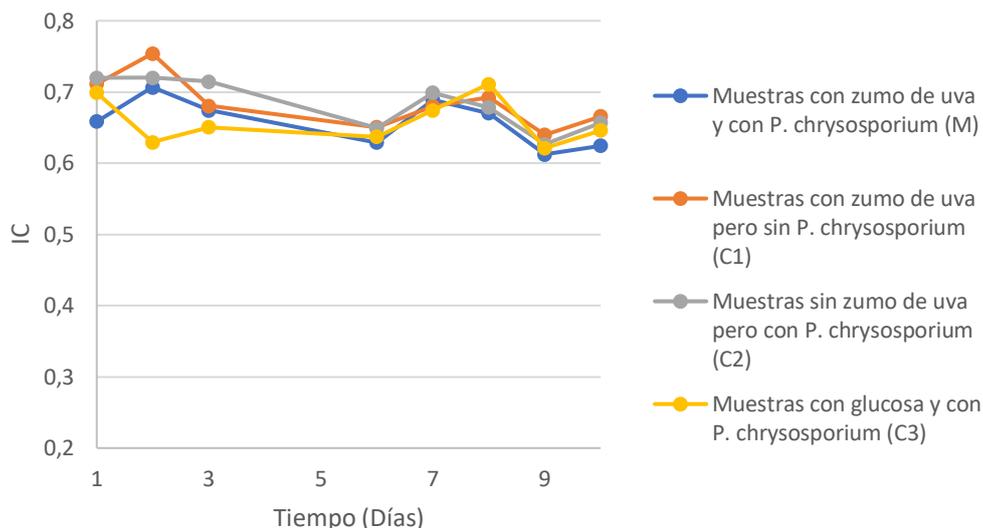


Figura 27. Evolución del Índice colorimétrico durante el Ensayo 1 sobre el licor de biometanización (se muestra la media de los duplicados).

Como puede observarse en la Figura 27, la variación del IC durante el tratamiento es muy baja, siendo prácticamente insignificante. Esto refleja que la degradación de compuestos que se produjo en la muestra no afectó a aquellas moléculas responsables del color de la muestra en ninguno de los casos.

4.2.2. Ensayo 2

4.2.2.1. Evolución del pH

Como el empleo de una disolución tampón no dió resultados en la regulación del pH, se optó por la regulación manual del mismo.

El pH inicial se ajustó a un valor dentro del intervalo de 5 a 5,5, óptimo para la actividad de *P. chrysosporium* (Hailei et al., 2016). Se escogió este valor inicial para compensar la subida de pH consecuente de la actividad microbiológica hasta el momento de la regulación manual, al no utilizarse ninguna solución tampón que mantuviese estable el pH. La gráfica en la que se plasma la evolución de este parámetro durante el tratamiento presenta un perfil de sierra, como consecuencia de la adición de HCl cada día para devolver el pH al intervalo óptimo (de 4 a 6).

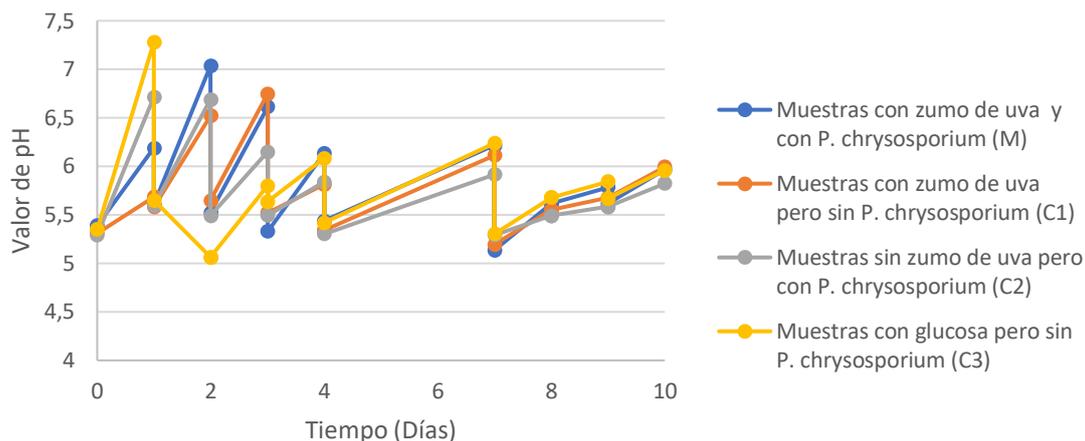


Figura 28. Evolución del pH durante el Ensayo 2 sobre el licor de biometanización (se muestran los valores medios de los duplicados).

En la Figura 28 puede observarse que los primeros días de tratamiento el pH muestra una mayor tendencia a aumentar, alcanzándose valores que incluso llegan a superar la neutralidad. Conforme avanza el tratamiento los valores se van estabilizando sufriendo una menor variación.

La evolución mostrada en la representación figura puede deberse a que al inicio del tratamiento la concentración de materia biodegradable era elevada, como consecuencia de su degradación se produjeron compuestos que provocaron la subida en el pH. Conforme los microorganismos actuaron a lo largo del tratamiento, la concentración de materia biodegradable fue disminuyendo. Esto provocó la disminución de la actividad microbiana y la formación de compuestos que basifican el medio, siendo más sencillo el control del mismo. A partir del día 8 no fue necesaria la adición de ácido ya que no llegó a superarse el pH de 6.

4.2.2.2. Carbohidratos totales

Los carbohidratos presentes en una muestra difieren unos de otros por su complejidad estructural, lo que afecta a su biodegradabilidad. La evolución de la concentración de carbohidratos totales de cada una de las muestras se recoge en la Figura 29.

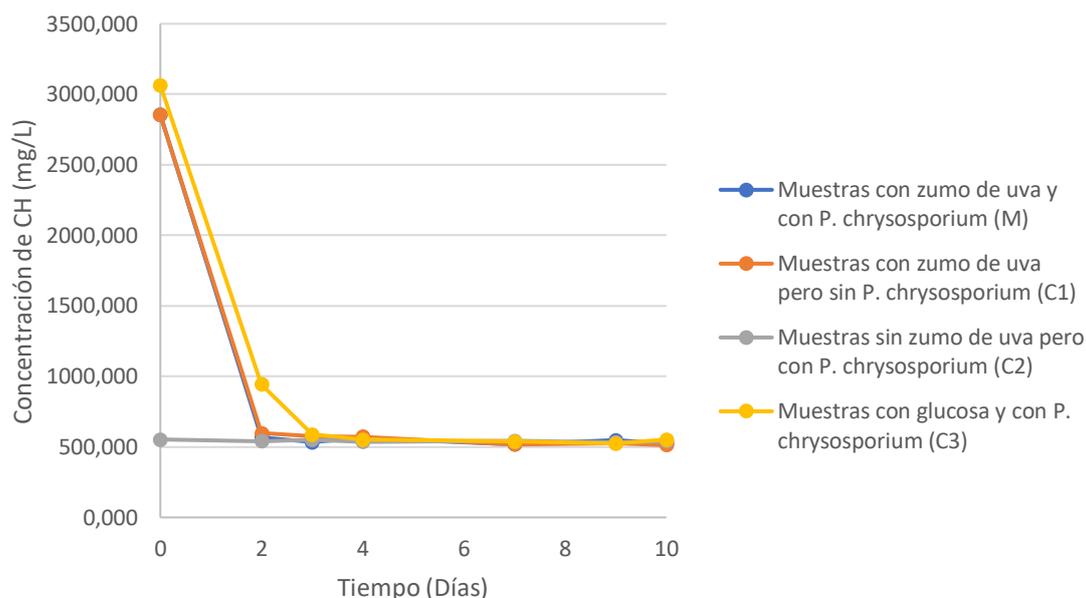


Figura 29. Evolución de la concentración de carbohidratos totales durante el Ensayo 2 sobre el licor de biometanización (se muestran los valores medios de los duplicados).

Las muestras suplementadas con algún tipo de azúcar (M, C1 y C3) tienen una concentración inicial mayor que aquellas no suplementadas (C2), como era de esperar. M y C1 parten de una concentración de 2.854 mg/L, C3 de 3.063 mg/L, mientras que C2 tiene 551 mg/L al iniciarse el ensayo.

El comportamiento con respecto a los carbohidratos de este ensayo es muy similar al observado en el Ensayo 1.

La disminución de la concentración de carbohidratos de la muestra C2 es casi inapreciable, manteniéndose constante a lo largo del tratamiento. El día 10 de ensayo se obtiene una concentración final de 541 mg/L.

Las muestras suplementadas durante los primeros días sufren una brusca bajada en sus niveles de carbohidratos, alcanzando M y C1 el segundo día de tratamiento los niveles de C2. Mientras que la muestra con glucosa (C3) no es hasta el tercer día cuando logra alcanzar el valor en el que se mantiene estable. Durante el resto del tratamiento la concentración de estos compuestos se mantiene constante, obteniéndose en todos los casos concentraciones muy similares y próximas a la concentración inicial de la muestra sin suplementar (C2). Así, los carbohidratos degradados por parte de las muestras suplementadas son prácticamente aquellos adicionados de forma exógena, sin que los hongos sean capaces de degradar los carbohidratos complejos presentes en la muestra inicial.

4.2.2.3.Demanda química de oxígeno

La evolución de la DQO presente en las muestras durante el tratamiento se presenta en la Figura 30. Cabe destacar que en este Ensayo 2, al no añadir solución tampón a la muestra, no hay efecto de dilución y se parte de una concentración de DQO superior que en el Ensayo 1.

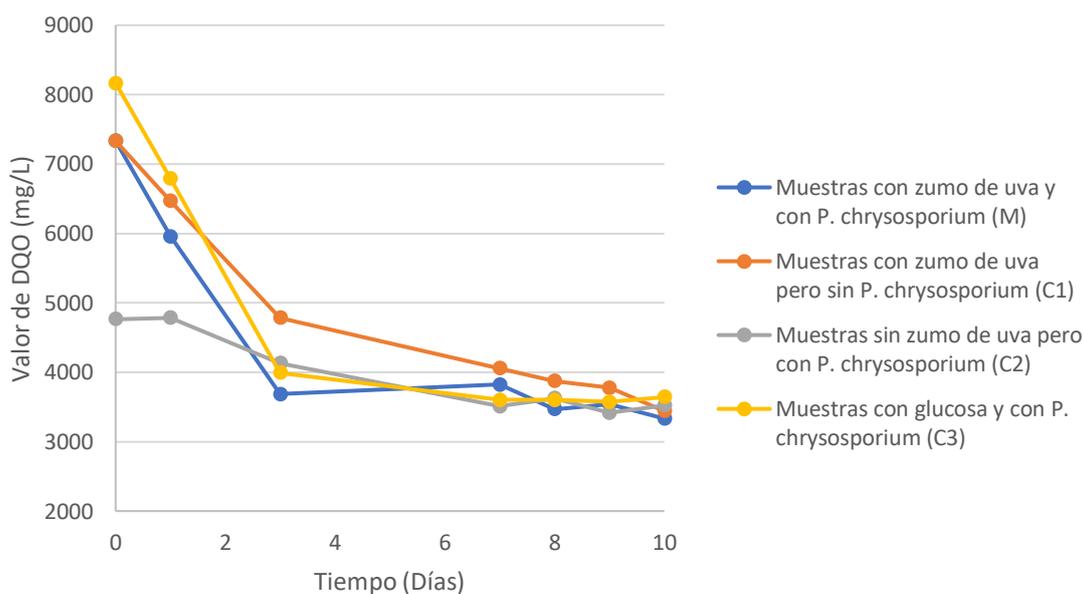


Figura 30. Evolución de la de DQO durante el Ensayo 2 sobre el licor de biometanización (se muestran los valores medios de los duplicados).

Como es lógico, las muestras que han sido suplementadas parten de una DQO mayor que aquellas que no lo han sido. Así, la muestra suplementada con glucosa (C3) parte de una DQO inicial de 8.167 mg/L, siendo mayor que las correspondientes a las muestras suplementadas con zumo de uva (M y C1), cuya concentración es de 7.333 mg/L. La muestra sin suplementar (C2) tiene una DQO inicial de 4.767 mg/L.

La actuación microbiológica provoca la bajada rápida de sus niveles de DQO durante los primeros días de ensayo, alcanzando en todos los casos una DQO final próxima a 3.500 mg/L. Sin embargo, el tiempo que tardan en alcanzar una concentración en la cual se estabilizan es distinto entre las muestras. La muestra con hongo y suplementada con zumo de uva (M) es la que necesita menor tiempo, teniendo el tercer día un valor de DQO de 3.683 mg /L. La muestra suplementada con glucosa (C3) es la segunda con una mayor

degradación el tercer día, alcanzando una concentración de 3.991 mg/L. En el caso de la muestra sin suplementar, pero con hongo (C2), el tercer día presenta una concentración de 4.133 mg/L. Por último, la muestra que tiene unos niveles mayores de DQO al tercer día es aquella a la que no se le inoculó *P. chrysosporium*, siendo esta de 4.783 mg/L, muy similar a la DQO inicial de la muestra sin suplementar.

Al observarse diferencias en cuanto a la velocidad de disminución de la DQO, se calculan los porcentajes de degradación con respecto a la DQO de la muestra sin suplementar a tiempo intermedio (día 3) y final (día 10) y se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6. Porcentajes de degradación de los valores de DQO al tercer y décimo día de análisis en el Ensayo 2 (se usó el valor de DQO sin suplementar como muestra inicial).

Muestras	% Degradación de DQO al tercer día	% Degradación de DQO al finalizar el tratamiento
M	22,73	30,07
C1	-0,35	27,80
C2	13,29	26,05
C3	16,26	23,60

Como se observa en la Tabla 6, al tercer día de ensayo las muestras con un mayor porcentaje de degradación son aquellas a las que se les había inoculado *P. chrysosporium*, pero dentro de estas, sobresale la muestra suplementada con zumo de uva (M) con un 22,73% de degradación, seguida de la muestra suplementada con glucosa (C3) y sin suplementar (C2), respectivamente. Tan solo en 3 días los hongos junto con la microflora autóctona son capaces de degradar la DQO aportada por el suplemento y comienza a degradar los compuestos orgánicos presentes en la muestra inicial. El empleo de suplemento de azúcar consigue acelerar el proceso, obteniéndose mejores resultados cuando se emplea un azúcar residual como es el caso del aportado por el zumo de uva. Por el contrario, cuando no se emplea hongo, en este tiempo los microorganismos autóctonos solo son capaces de degradar la materia orgánica fácilmente asimilable aportada por el suplemento. A este tiempo los resultados de las muestras sin suplementar son muy similares a los obtenidos en Díaz et al. 2018, con una degradación del 18%. Al cabo de 10 días de tratamiento, todas las muestras presentaban unos valores de degradación de DQO similares (entre 24 y 30 % de degradación de DQO), si bien es

destacable que de nuevo los mejores resultados se obtienen con la muestra inoculada con hongo y suplementada con zumo de uva (M).

4.2.2.4. Demanda bioquímica de oxígeno

En la Figura 31 se pueden ver las diferencias en la DBO₅ de las muestras a tres tiempos de tratamiento.

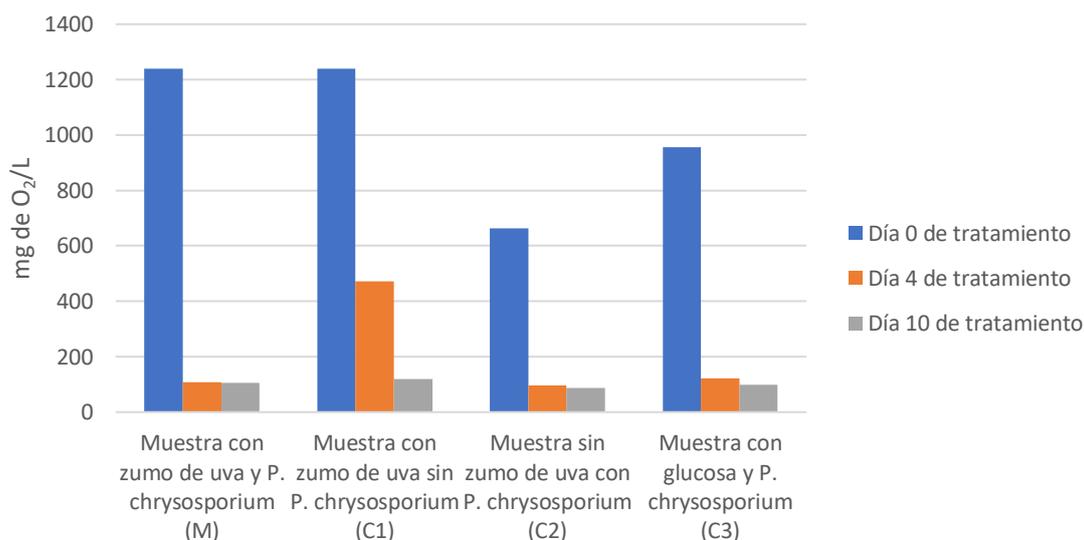


Figura 31. Valores de la DBO₅ de los días 0, 4 y 10 del Ensayo 2 sobre el licor de biometanización (se muestran los valores medios de los duplicados).

Las muestras iniciales parten con diferencias en este parámetro debido a la suplementación con azúcar de fácil asimilación. Por ello, las muestras M, C1 y C3 poseen unos valores de partida mayores, siendo para las suplementadas con zumo de uva alrededor de 1.200 mg O₂/L y 1.000 mg O₂/L en el caso de la glucosa. La muestra sin suplementar es la que tiene un menor valor de DBO₅ inicial, siendo este de 660 mg O₂/L. El cuarto día de análisis, se observa que en las muestras inoculadas con *P. chrysosporium* la DBO₅ se redujo hasta valores próximos a 100 mg O₂/L. La muestra sin microorganismo inoculado (C1) presenta el cuarto día una concentración de materia biodegradable más elevada que el resto, con un valor de DBO₅ de 470 mg O₂/L. Este resultado corrobora el obtenido en el análisis de DQO a tiempo intermedio, siendo aquellas muestras con inoculación las que mayor velocidad de degradación poseen gracias a la actividad enzimática de los hongos.

Al finalizar el ensayo, todas las muestras poseen valores muy similares de DBO₅, por lo que se observa que todas las muestras, independientemente de la suplementación e

inoculación, alcanzan al finalizar el ensayo valores similares, al igual que ocurre con la DQO.

4.2.2.5. Biodegradabilidad

La comparación entre la biodegradabilidad inicial y final de las muestras del Ensayo 2 se presenta en la Figura 32.

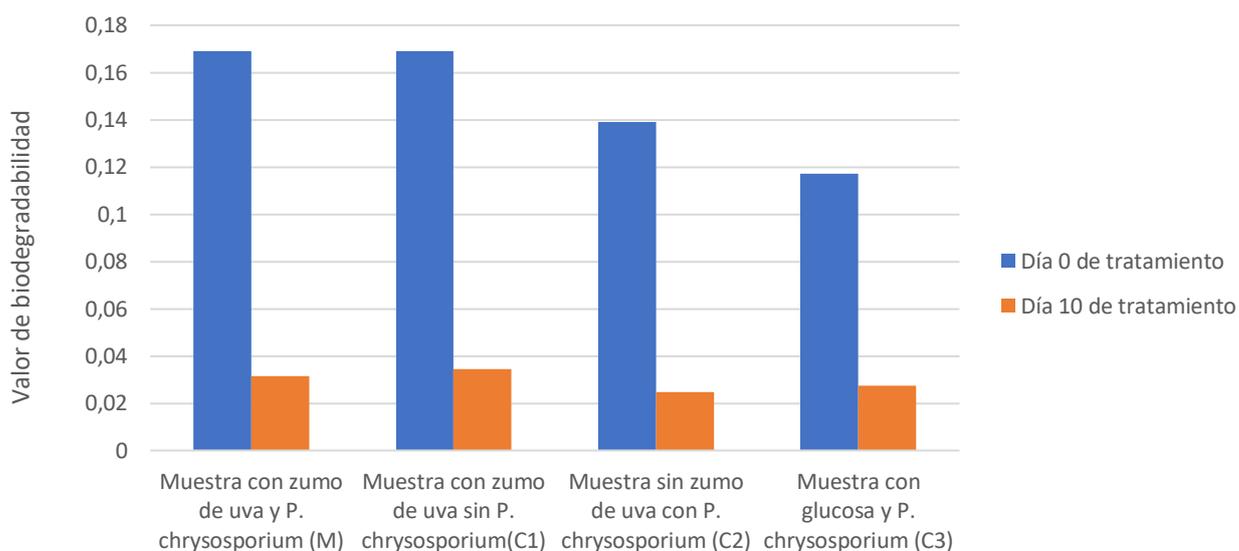


Figura 32. Comparación entre los valores iniciales y finales de biodegradabilidad en el Ensayo 2 sobre el licor de biometanización (se muestran los valores medios de los duplicados).

Observando la Gráfica 32 podemos ver que, tras el tratamiento, las muestras sufren una importante disminución de la biodegradabilidad, obteniéndose valores ligeramente inferiores en las muestras C2 y C3.

Los resultados en cuanto a la biodegradabilidad final de la muestra son similares a los obtenidos en el Ensayo 1.

4.2.2.6. Determinación del Índice colorimétrico

El color de una muestra viene determinado por la composición de la misma, siendo una de las características a tener en cuenta en un agua residual que podría impactar en el sistema acuático, por lo que sus niveles son regulados por la legislación (siendo potestad

de las autonomías). Durante el tratamiento fue uno de los análisis realizados, determinándose si durante este, se degradaban compuestos que interviniesen sobre el color de la muestra. En la Figura 33 se muestra la tendencia del IC durante el tratamiento Ensayo 2.

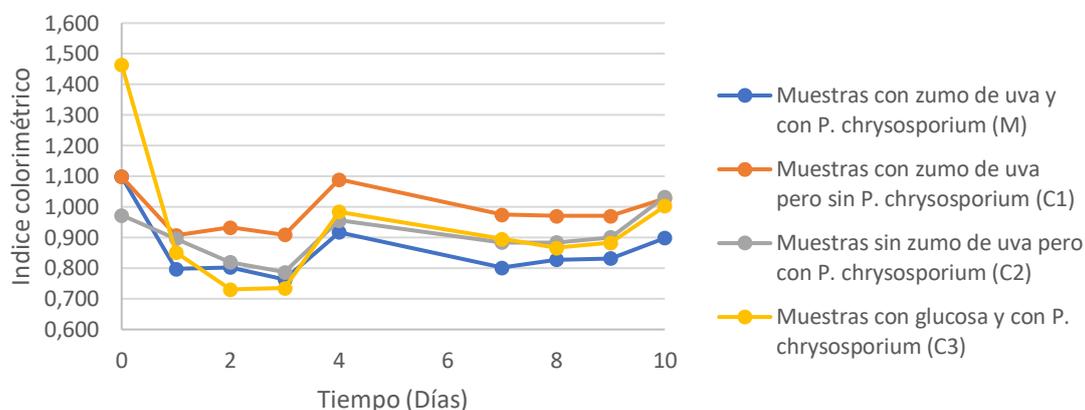


Figura 33. Evolución del IC durante el Ensayo 2 sobre el licor de biometanización (se muestran los valores medios de los duplicados).

La tendencia observada en la Figura 33 sobre la evolución del IC es que se produce una ligera disminución durante los primeros días de tratamiento coincidiendo con el momento de mayor tasa de degradación de compuestos de las muestras (Collivignarelli et al., 2019). Sin embargo, a medida que va desarrollándose el tratamiento, se recuperan valores cercanos a los iniciales.

Al finalizar el tratamiento, las muestras control C1, C2 y C3 tienen un valor de IC superior al que tiene la muestra inoculada con hongo y suplementada con zumo de uva, proporcionando de nuevo los mejores resultados (M).

4.3. Biotratamiento con hongos sobre el licor negro

4.3.1. Ensayo 3

Dada la elevada concentración de contaminantes en el licor negro ($DQO > 100$ g/L) antes del tratamiento, se diluyó en proporción 1:25 para evitar la inhibición de la actividad microbiana.

4.3.1.1. Medida del pH

En la Figura 34 se muestra la evolución del pH durante el Ensayo 3. En este ensayo el pH se controló de manera manual mediante la adición de HCl. Puede observarse que, para un mismo tiempo, las muestras presentan dos valores, uno de ellos corresponde con el valor medido al tomar la muestra del día correspondiente, mientras que el segundo valor corresponde al valor de pH obtenido tras ser regulado manualmente, devolviéndolo al intervalo óptimo de actuación de *P. chrysosporium*.

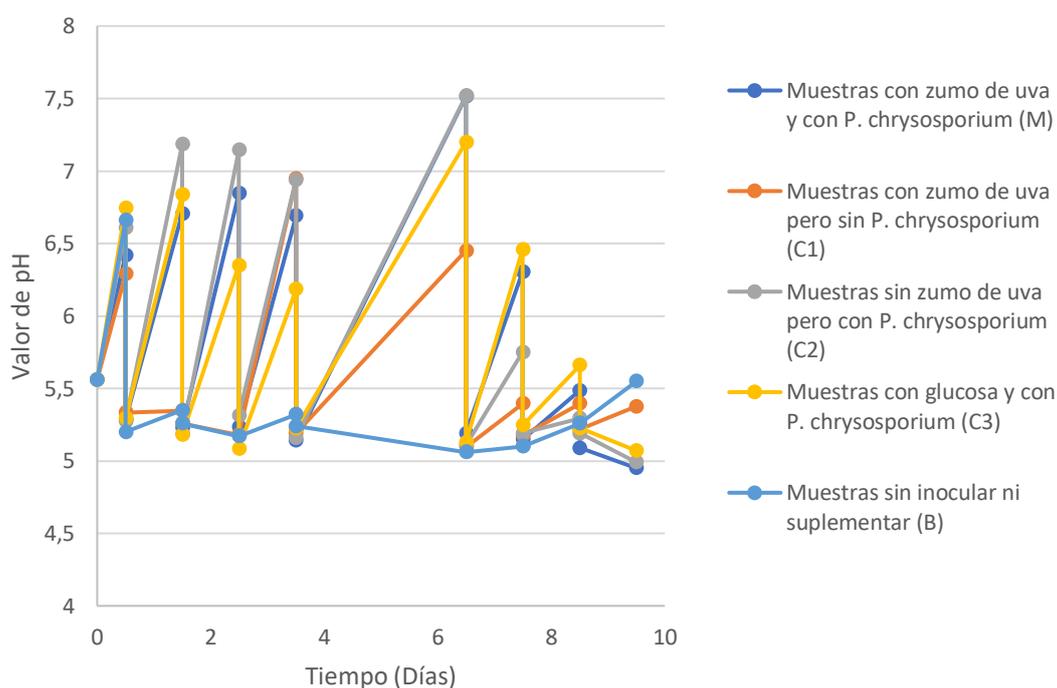


Figura 34. Evolución del pH durante Ensayo 3 sobre el licor negro (se muestran los valores medios de los duplicados).

El pH inicial fue ajustado en todos los casos a 5,5. Durante el tratamiento experimental se produce la degradación de compuestos que se encuentran en el residuo líquido tratado y como consecuencia de ello se produce la formación de moléculas responsables de la variación del pH. Al igual que ocurría con el licor de biometanización (Ensayo 1 y 2), la tendencia natural del pH es aumentar de manera significativa. En los inicios del tratamiento el licor negro presenta una mayor carga contaminante, tanto de materia biodegradable como no biodegradable. Por ello, en los primeros días de tratamiento se produce una mayor degradación, viéndose reflejado en la mayor variación del pH que en algunos casos llega a superar el valor de 7. La variación de este parámetro en las muestras

durante los días finales es menor, debido a que la cantidad de materia que puede ser degradada por microorganismos es inferior, alterando en menor medida el pH.

Todas las muestras tratadas presentan una evolución similar en el valor de pH, salvo la muestra de licor sin suplementar ni inocular (B), de la que, salvo el primer día de ensayo, se obtienen valores prácticamente constantes hasta el final del tratamiento, lo que parece indicar que no hubo actividad microbiológica.

4.3.1.2. Carbohidratos totales

Los carbohidratos, tanto simples como complejos, fueron analizados, determinando su concentración a diferentes tiempos del ensayo. La evolución de este grupo de compuestos se presenta en la Figura 35.

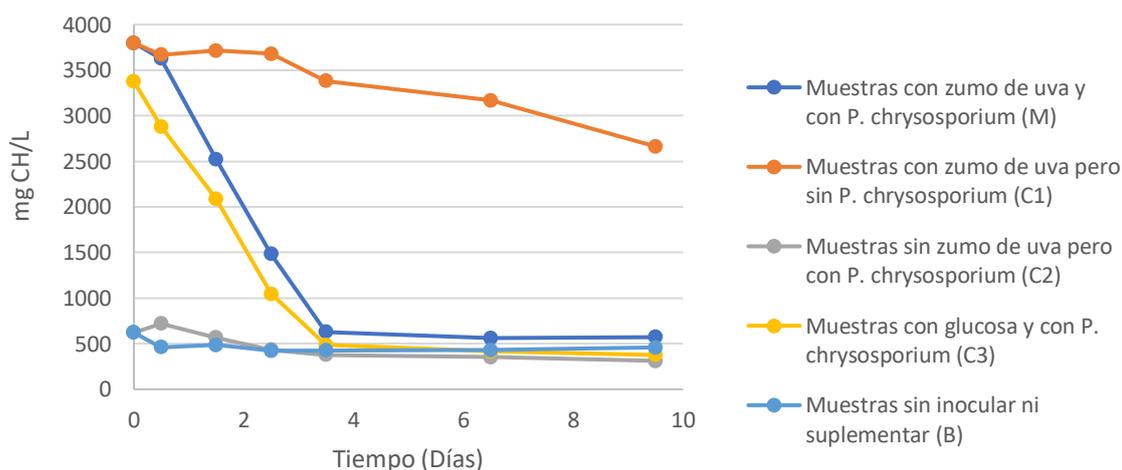


Figura 35. Evolución de la concentración de carbohidratos durante el Ensayo 3 sobre el licor negro (se muestran los valores medios de los duplicados).

Como puede observarse en la Figura 35, en el momento de inicio del tratamiento las muestras suplementadas se encuentran con unos niveles de carbohidratos mayores que las no suplementadas, debido a la adición de azúcares fácilmente fermentables.

Las muestras no suplementadas tienen unos valores iniciales de concentración de 622 mg/L, que se van reduciendo lentamente hasta al alcanzar el día 10 de ensayo valores de 458 mg/L la muestra no inoculada (B) y 311 mg/L la muestra inoculada con hongo (C2). Por otra parte, aquellas muestras suplementadas e inoculadas con el hongo (M y C3) sufren una caída de su concentración inicial de carbohidratos, alcanzando el cuarto día la

concentración de aquellas no suplementadas. Se puede observar que la muestra C1, la cual no se inoculó con microorganismos, presenta una velocidad de consumo de carbohidratos muy inferior a las muestras inoculadas. Su concentración final es de 2.663 mg/L, si bien, al final del experimento se continuaba consumiendo.

En definitiva, se comprueba que en las muestras suplementadas los carbohidratos principalmente consumidos durante el tratamiento sobre el licor negro son los azúcares sencillos añadidos al suplementar.

Se observa también que la inoculación de las muestras con hongo permite aumentar la eficiencia del tratamiento, obteniéndose los mejores resultados con la muestra no suplementada pero inoculada (C2), en la que se consigue degradar el 50% de los carbohidratos iniciales.

4.3.1.3. Demanda química de oxígeno

El licor negro presenta un alto contenido en materia orgánica que procede de las células vegetales, principalmente de la pared vegetal como la lignina, cuya estructura y composición la convierten en una molécula de compleja eliminación (Cesarino et al., 2012). La evolución de la DQO durante el biotratamiento se muestra en la Figura 36.

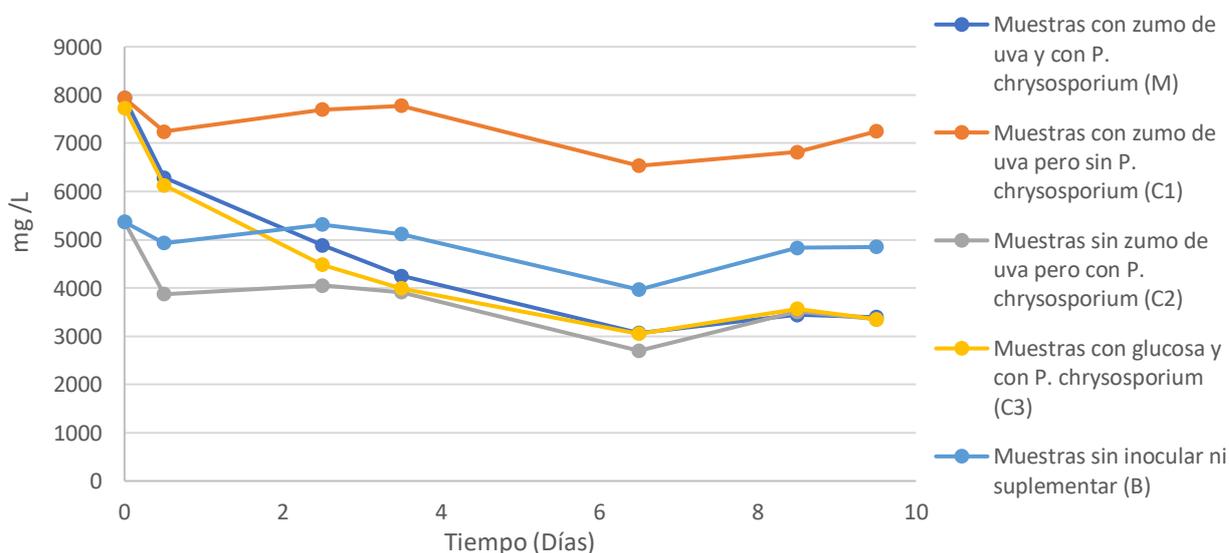


Figura 36. Evolución de la DQO durante el Ensayo 3 sobre el licor negro (se muestran los valores medios de los duplicados).

Como puede observarse en la Figura 36, todas las muestras evolucionan de distinta forma. Las muestras suplementadas con zumo de uva parten de un valor de DQO de 7.900 mg/L,

mientras que a las que se le adicionó glucosa de 7.800 mg/L. La DQO de las muestras iniciales no suplementadas era de 5.400 mg/L.

A continuación, se realiza un análisis individual de la evolución de cada una de las muestras:

- Muestra sin suplementar ni inocular (B): presenta una lenta disminución de la DQO presente inicialmente en la muestra, alcanzando un mínimo en torno al sexto día que aumenta de nuevo hasta un valor de DQO de 4.850 mg/L al final del tratamiento.
- Muestra inoculada con hongo y suplementada con zumo de uva (M): La DQO inicial disminuye a gran velocidad durante el tratamiento, alcanzando su valor mínimo el día 6 y posteriormente sufre un ligero incremento hasta presentar a los 10 días un valor de 3400 mg/L.
- Muestra suplementada con zumo de uva, pero sin inocular hongo (C1): La disminución de DQO es reducida, ya que la carga microbiana presente inicialmente en la muestra no es capaz de degradar gran parte de la materia orgánica presente, ni siquiera la materia orgánica fácilmente asimilable.
- Muestra sin suplementar, pero inoculada con hongo (C2): Comparándola con la muestra B sin hongo, se comprueba que la inoculación de hongo es determinante para aumentar la eficiencia en la degradación de compuestos. Al finalizar el tratamiento, el valor de DQO es de 3.350 mg/L, muy por debajo del obtenido en la muestra B. se observa también un mínimo a los 6 días.
- Muestra suplementada con glucosa e inoculada con hongo (C3): La evolución de esta muestra es muy similar a la obtenida en la muestra M, finalizando con valores casi idénticos.

Durante el pretratamiento, el licor negro no fue centrifugado, por lo que presenta sólidos en suspensión, de forma que durante el tratamiento la liberación de enzimas y las transformaciones que tienen lugar pueden hacer que se solubilicen estos sólidos, lo que

puede derivar en un aumento de la DQO explicando el aumento detectado en los últimos días del tratamiento.

Tabla 7. Porcentaje de degradación de DQO en días 6 y 10 del Ensayo 3 sobre el licor negro.

Muestra	% de degradación de DQO a día 6	% de degradación de DQO a día 10
Agua residual con zumo de uva e inóculo (M)	42,9	36,64
Agua residual con zumo de uva, pero sin inóculo (C1)	-21,7	-35,09
Agua residual sin suplemento, pero con inóculo (C2)	49,7	37,58
Agua residual con glucosa e inóculo (C3)	43,2	37,56
Agua residual sin suplemento ni inóculo (B)	26,1	9,63

En la Tabla 7 se muestran los porcentajes de degradación de DQO al finalizar el tratamiento de las muestras, con respecto a la muestra original sin suplementar. De este modo, se puede determinar la DQO eliminada en cada caso.

La disminución del valor de DQO durante el tratamiento de la muestra sin suplementar ni inocular (B) es reducido, con un porcentaje de solo 9,6%.

Se observa que, para el licor negro, los resultados obtenidos son independientes de la suplementación o no con azúcares simples, y todas las muestras inoculadas con *P. chrysosporium*, alcanzan, al finalizar el tratamiento similares porcentajes de degradación (~37%). Estos valores son muy similares a los obtenidos por otros estudios que analizaban la actuación de *P. chrysosporium* sobre este efluente, logrando alcanzar un 36,8% de remoción en la DQO (Pérez-Pérez et al., 2015). En estos, además de este tratamiento, analizan otros distintos o la combinación de varios, comparando las diferencias en los resultados obtenidos. En cambio, son más elevados que los obtenidos en Díaz et al. 2018, en el cual se obtuvo un 22% de degradación.

En cambio, en la muestra C1, que no ha sido inoculada, pero si suplementada con azúcares, no logra reducir su nivel, ni siquiera hasta alcanzar la concentración presente

en el licor original. En consecuencia, al finalizar el tratamiento presenta un porcentaje de degradación de DQO negativo.

A la vista de los resultados, la inoculación de *P. chrysosporium* es indispensable para lograr que el biotratamiento resulte eficaz. Estos resultados están en conformidad con otros estudios en los que se analiza el tratamiento de residuos con compuestos como la lignina, sobre la que actúan las enzimas extracelulares secretadas por el hongo, destacando LiP y MnP (Hammel, 1995). Estas actúan rompiendo enlaces que unen las subunidades que la componen, descomponiendo su estructura, lo que provoca que aumente su biodegradabilidad.

4.3.1.4. Demanda bioquímica de oxígeno

La cantidad de materia orgánica biodegradable presente en cada muestra en distintos momentos del tratamiento se muestra en la Figura 37.

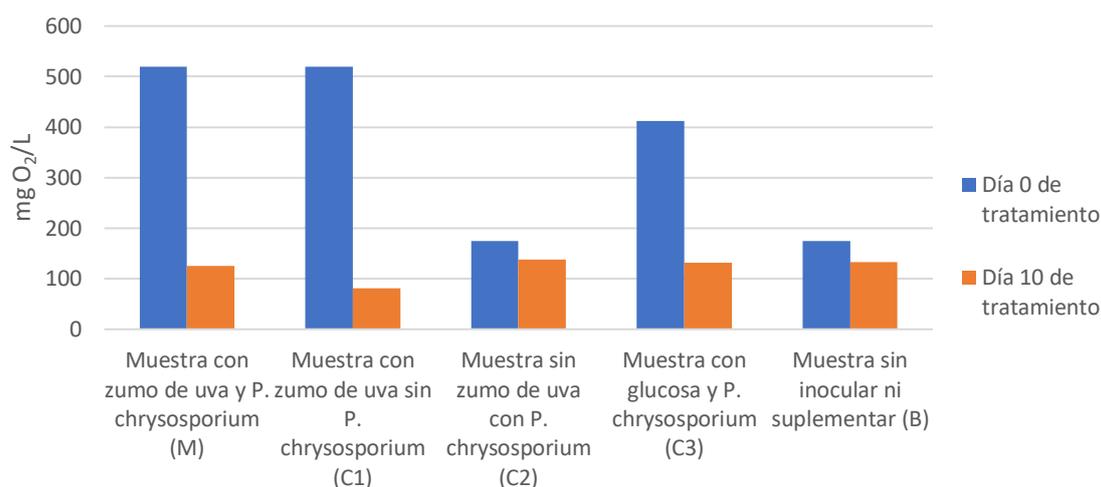


Figura 37. Valores de DBO₅ inicial y final del Ensayo 3 sobre el licor negro (se muestran los valores medios de los duplicados).

La muestra sin inocular ni suplementar (B) presenta una cantidad de materia biodegradable final similar a la inicial, esto se debe a que los microorganismos presentes originalmente no son capaces de consumirla en su totalidad.

Sin embargo, la muestra C1, que se diferencia de B en que ha sido suplementada con azúcar simple, si presenta una reducción significativa de la materia biodegradable. Los

microorganismos endógenos logran degradar parte de la materia biodegradable presente en la muestra original.

Los valores de DBO₅ finales de las muestras con *P. chrysosporium* son similares, estando por encima de C1. El hongo inoculado se encarga de degradar la materia asimilable, pero, además, gracias a su actuación enzimática extracelular, actúa sobre la no biodegradable convirtiéndola en asimilable, conllevando el aumento de la cantidad de moléculas biodegradables de la muestra (Martínez et al., 2004) que luego son consumidos dando lugar a la reducción observada en la DQO y en la DBO₅.

4.3.1.5. Biodegradabilidad

La biodegradabilidad al inicio y final del tratamiento para las distintas muestras se presentan en la Figura 38.

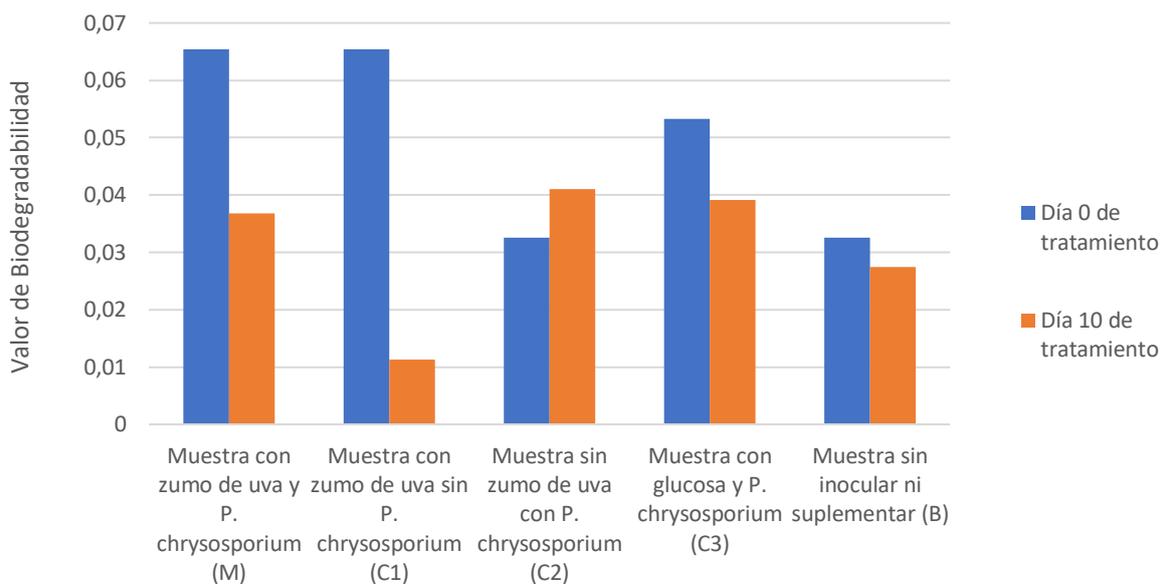


Figura 38. Valores iniciales y finales de Biodegradabilidad en el Ensayo 3 sobre el licor negro (se muestran los valores medios de los duplicados).

La biodegradabilidad inicial de las muestras es muy inferior a 0,5, lo que indica que se trata de una muestra muy poco biodegradable (Meena et al. 2019)

Como se observa en la Figura 38, la muestra B presenta una leve disminución de la biodegradabilidad, resultado del tratamiento experimental, debido a la actuación microbiológica endógena del licor negro.

Analizando conjuntamente las muestras B y C2 que únicamente se diferencian en que la segunda ha sido inoculada con hongo, se comprueba que la actividad de *P. chrysosporium* es fundamental, debido a que en la muestra C2 se observa un incremento de la biodegradabilidad respecto a la original. Esto se debe a que *P. chrysosporium* ha actuado sobre parte de la materia orgánica no biodegradable, convirtiéndola en componentes asimilables por los microorganismos.

Las muestras suplementadas con azúcar de la uva, M y C1, presentan una biodegradabilidad inicial similar, pero finalizado el tratamiento, el valor en C1, no inoculado con hongo, se reduce debido a la actuación de los microorganismos endógenos sobre la materia biodegradable, disminuyendo la relación DBO_5/DQO . En el caso de M (inoculada con hongo), también se reduce dicha relación, lo que era de esperar, por el consumo de los microorganismos y del hongo, pero, gracias a la actuación del hongo, que convierte parte de la materia no biodegradable en biodegradable, se consume mayor cantidad de materia orgánica y la biodegradabilidad de la muestra tratada es superior que en C1.

Estudiándose de forma conjunta M y C3, se observa que la utilización de la glucosa pura o del azúcar de la uva para la estimulación de *P. chrysosporium*, influye muy poco en el resultado final del tratamiento, al tener ambas muestras finales valores de biodegradabilidad similares. Estos valores son ligeramente inferiores a los obtenidos en el caso de C2 (sin suplementar, pero inoculada con hongo) lo que muestra de nuevo que en el caso del licor negro no es necesario suplementar con azúcar.

4.3.1.6. Índice colorimétrico

El residuo líquido generado por la industria papelera, conocido como licor negro, está compuesto por una serie de componentes como lignina, celulosa, compuestos aromáticos etc. Estos provocan que el color de licor como su nombre indica, sea negro intenso (Adikane et al., 2003). El tratamiento de este residuo líquido da lugar a la modificación química del mismo pudiéndose alterar el índice colorimétrico. Por ello, se comprobó la evolución de este parámetro, que se muestra en la Figura 39.

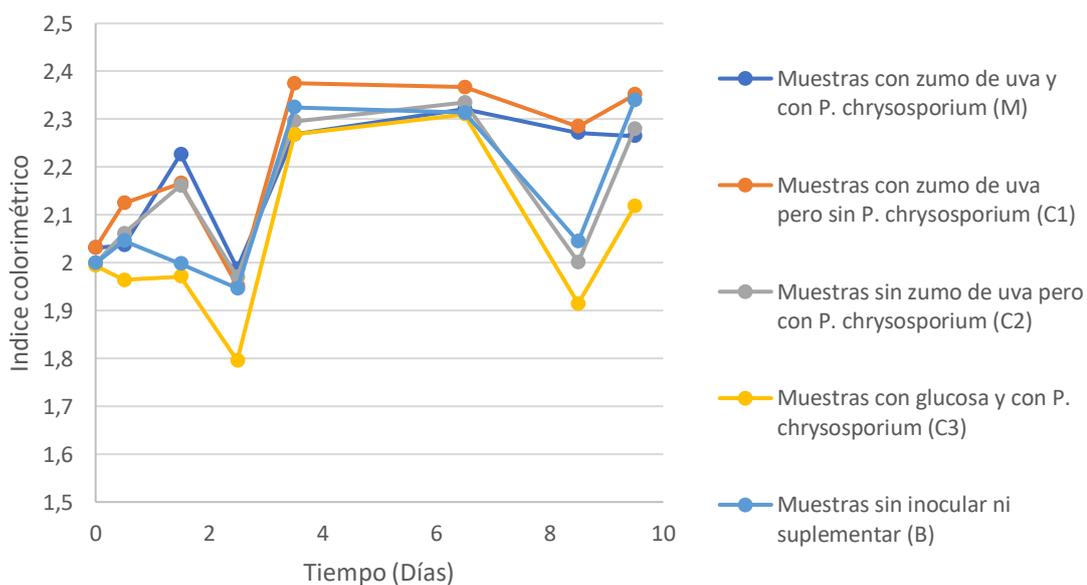


Figura 39. Evolución del Índice colorimétrico durante Ensayo 3 sobre el licor negro (se muestran los valores medios de los duplicados).

Como se puede observar, las transformaciones sufridas durante el tratamiento, lejos de lograr reducir el IC, provocan un ligero aumento del mismo en todos los casos.

4.4. Microscopio electrónico de barrido

Las imágenes tomadas en el SEM de las muestras se muestran en la Figura 40.

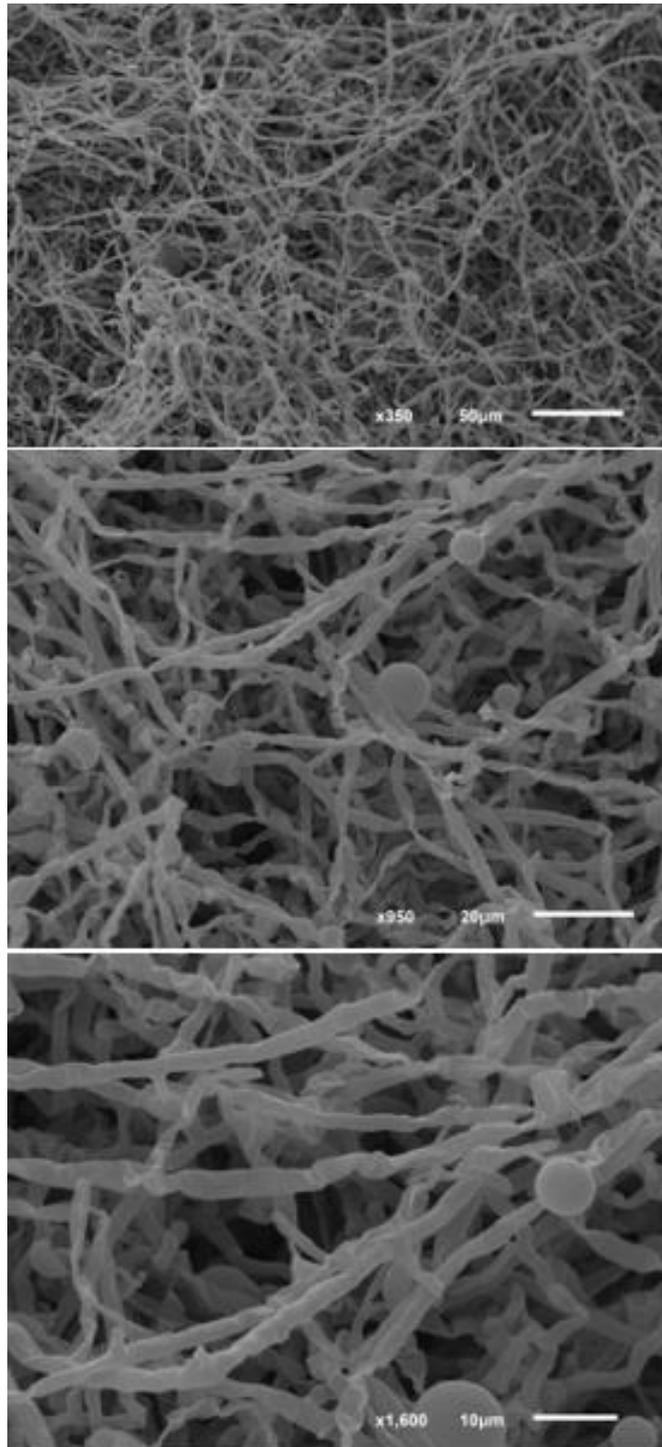


Figura 40. Imágenes de *P. chrysosporium* en el momento previo al tratamiento, obtenidas gracias al microscopio electrónico de barrido, colocados de menos a más aumentos, de arriba hacia abajo, respectivamente.

Las imágenes corresponden a cada uno de los pellets de *P. chrysosporium* que han sido fotografiados a diferentes aumentos para analizar su disposición, estructura y evolución

durante el tratamiento. En la Figura 40, se muestran las imágenes correspondientes al microorganismo antes de someterse al tratamiento. Se observa que está compuesto por dos estructuras diferenciadas. Las células son aquellas estructuras esféricas presentes en un enmarañado de estructuras fibrosas, que corresponden a las hifas.

Con el fin de comprobar si el tratamiento experimental afecta a la disposición y estructura de los pellets, se analizaron imágenes tomadas por el SEM de estos a la finalización del experimento. Su estructura se muestra en la Figura 41.

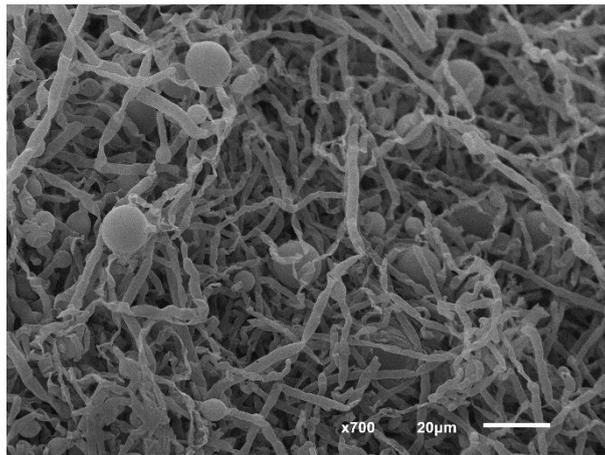


Figura 41. Imagen de *P. chrysosporium* a la finalización del tratamiento experimental tomado por el SEM.

Comparando las imágenes de los pellets de *P. chrysosporium* en el momento anterior y posterior al tratamiento experimental se determina que no hay una diferencia clara entre ambas imágenes, con lo que parece posible la reutilización de los pellets del hongo para varios tratamientos, aunque esto deberá ser corroborado experimentalmente con el fin de detectar si existe pérdida de actividad con el tiempo.

5. CONCLUSIONES

1. Controlar el pH dentro de los valores óptimos resulta indispensable para la actividad de *P. chrysosporium*.
2. Cuando se mantiene el pH dentro de los valores óptimos, la inoculación del hongo y la suplementación de azúcar permite reducir el tiempo de tratamiento del licor de biometanización a la mitad, lográndose eficacias de eliminación de DQO próximas al 30%
3. La suplementación del licor de biometanización con zumo de uva residual permite obtener los mismos resultados que cuando se suplemente con glucosa.
4. La inoculación de *P. chrysosporium* es indispensable para lograr la reducción de los niveles de contaminantes presentes en el licor negro, con una eficacia de eliminación de la DQO del 37%.
5. El licor negro dispone de suficientes compuestos fácilmente degradables inicialmente como para que no sea necesario suplementar con azúcar para activar el hongo.

6. ABREVIATURAS Y SIMBOLOS

C1: muestras con aguas residuales, con zumo de uva pero sin *P. chrysosporium*.

C2: muestras con agua residual, sin suplementación con azúcar, pero con *P. chrysosporium*.

C3: muestras con agua residual, con glucosa y con *P. chrysosporium*.

DBO₅: Demanda Bioquímica de Oxígeno de 5 días de análisis.

DBO_{final}: Demanda Bioquímica de Oxígeno con oxidación de la totalidad de la materia biodegradable.

DDT: Dicloro Difenil Tricloroetano.

DQO: Demanda Química de Oxígeno.

EDAR: Estación Depuradora de Aguas Residuales.

EDARU: Estación Depuradora de Aguas Residuales Urbanas.

FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura.

FEN: Fundación Española de la Nutrición.

IC: Índice Colorimétrico.

LiP: Lignina Peroxidasa.

M: muestras con agua residual, zumo de uva y *P. chrysosporium*.

ME: Extracto de Malta.

MEA: Extracto de Malta Agar.

MITECO: Ministerio para la Transición Ecológica..

MnP: Manganeso Peroxidasa.

OIV: Organización Internacional del Vino.

P. chrysosporium: *Phanerochaete chrysosporium*..

Ppm: Partes por Millón.

CH: Carbohidratos

7. BIBLIOGRAFIA

Adikane, H.V., Thakar, D.M. & Nene, S.N. (2003). Optimisation of colour and sugar rejection of black liquor using membranes.

Alias, R.A., Yukesh, R., Sindhu, J., Ragavi, J., Kumar, G., Gunasekaran, M. & Rajesh, J. (2019). Trends and resource recovery in biological wastewater treatment system.

Barraco-Vega, M., Romero, H., Richero, M., Cerdeiras, M.P. & Cecchetto, G. (2017). Functional characterization of two novel purine transporters from the Basidiomycota *Phanerochaete chrysosporium*.

Behnood, M., Nasernejad, B. & Nikazar, M. (2014). Biodegradation of crude oil from saline waste water using white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*.

Cesarino, I., Araujo, P., Pereira, A. & Mazzafera P. (2012). An overview of lignin metabolism and its effect on biomass recalcitrance.

Collovignarelli, M.C., Abbà, A., Miino, M.C. & Damiani, S. (2019). Treatments for color removal from wastewater: State of the art.

Cotabarren, I.M., Moreno, J., Martínez, A.L., Cabrera, F.A. & Piña, J. (2019). Valorization of anaerobic digestion liquid residue through the production of organic fertilizer by fluidized bed granulation.

Cruz, A., Pariente, M. I., Vasiliadou, I., Padrino, B., Puyol, D., Molina, R. & Martínez F. (2017). Removal of pharmaceutical compounds from urban wastewater by an advanced bio-oxidation process based on fungi *Trametes versicolor* immobilized in a continuous RBC system.

Del Gobbo, L.M., Villegas, L.B. & Colin, V.L. (2019). The potential application of an autochthonous fungus from the northwest of Argentina for treatment of sugarcane vinasse.

Devesa-Rey, R., Vecino, X., Varela-Alende, J.L., Barral, M.T., Cruz, J.M. & Moldes, A.B. (2011). Valorization of winery waste vs. The cost of not recycling.

Díaz, A.I., Laca, A. & Días, M. (2018). Tratamiento de aguas industriales complejas mediante el empleo de hongos de pudrición blanca *Phanerochaete chrysosporium*. Universidad, Investigación y Conocimiento: Comprensión e intervención en una sociedad compleja. 501-508.

Díaz, A.I., Oulego, P., Collado, S., Laca, A., González, J.M. & Díaz, M. (2018) [1]. Impact of anaerobic digestion and centrifugation/decanting processes in bacterial communities fractions.

Espinisa-Ortiz, E.J., Rene, E.R., Pakshirajan, K., Van Hullebusch, E.D. & Lens P.N.L. (2015). Fungal pelleted reactors in wastewater treatment: Applications and perspectives.

Freitas, A.C., Ferreira, F., Costa, A.M., Pereira, R., Antunes, S.C., Gonçalves, F., Rocha-Santos, T.A.P., Diniz, M.S., Castro, L., Peres, I. & Duarte A.C. (2009). Biological treatment of the effluent from a bleached Kraft Pulp mill using basidiomycete and zygomycete fungi.

Hailei, W., Ping, L., Yu, Q. & Hui, Y. (2016). Removal of phenol in phenolic resin wastewater by a novel biomaterial: the *Phanerochaete chrysosporium* pellet containing chlamydospore-like cell.

Hammel, K.E. (1995). Mechanisms for Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Degradation by Ligninolytic Fungi.

Lafka, T-I., Sinanoglou, V. & Lazos, E.S. (2007). On the extraction and antioxidant activity of phenolic compounds from winery wastes.

Lauwaert, J., Stals, I., Lancefield, C.S., Deschaumes, W., Depuydt, D., Vanlerberghe, B., Devlamynck, T., Bruininckx, P.C.A. & Verberckmoes, A. (2019). Pilot scale recovery of lignin from black liquor and advanced characterization of the final product.

Li, X., Guo, S., Peng, Y., He, Y., Wang, S., Li, L., Zhao, M., (2017). Anaerobic digestion using ultrasound as pretreatment approach: Changes in waste activated sludge, anaerobic digestion performances and digestive microbial populations.

López, X., Taramuel, A., Arboleda, C., Segura, F. & Restrepo, L.F. (2016). Comparison of methods using sulfuric acid for determination of total sugars.

Martínez, D., Larrondo, L.F., Putnam, N., Sollewijn, M.D., Huang, K., Chapman, J., Helfenbein, K.G., Ramaiya, P., Detter, J.C., Larimer, F., Coutinho, P.M., Henrissat B., Berka, R., Cullen, D. & Rokhsar, D. (2004). Genome sequence of the lignocellulose degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium* strain RP78.

Murugesan, K., Selvan, A. & Wong, J. W. C. (2014). Flocculation and dewaterability of chemically enhanced primary treatment sludge by bioaugmentation with filamentous fungi.

Pérez-Pérez, E.M., Potentini, M.F., Araujo, E. & Rodríguez-Malaver, A. (2011). Remediación de la vinaza y el licor negro mediante tratamiento combinado de foto-Fenton y hongos de pudrición blanca.

Rernámdez-Gnzález, A.J., Valette, N., Kohler, A., Dumarçay, S., Sormani, R., Gelhaye, E., & Morel-Rouhier, M. (2018). Oak extractive-induced stress reveals the involvement of new enzymes in the early detoxification response of *Phanerochaete chrysosporium*.

Ruggieri, L., Cadena, E., Martínez-Blanco, J., Gasol, C.M., Rieradevall, J., Gabarrell, X., Gea, T., Sort, X. & Sánchez, A. (2009). Recovery of organic wastes in the Spanish wine industry. Technical, economic and environmental analyses of the composting process.

Shreve, M.J., Brockman A., Hartleb, M., Prebihalo, S., Dorman, F. L. & Brennan, R. A. (2016). The white-rot fungus *Trametes versicolor* reduces the estrogenic activity of a mixture of emerging contaminants in wastewater treatment plant effluent.

Timonen, K., Sinkko, T., Luostatinen, S., Tampio, E. & Joensuu, K. (2019). LCA of anaerobic digestion: Emission allocation for energy and digestate.

Tyagi, V.K., Fdez-Guelfo, L.A., Zhou, Y., Álvarez-Callego, C.J., Romero, L.I. & Jern, W. (2018). Anaerobic co-digestion of organic fraction of municipal solid waste (OFMSW): Progress and challenges.

Zhang, X., Shao, J., Chen, A., Shang, C., Hu, X., Luo, S., Ming, L., Peng, L. & Zeng, Q. (2018). Effects of cadmium on calcium homeostasis in the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*.

BUSQUEDAS EN INTERNET:

Web 1: <http://infontuccion.com>

Web 2: <https://www.lacasadebaco.net/2018/12/partes-de-la-uva-e-incidencia-en-el-vino/>. Para obtener información acerca de la uva.

Web3:<https://www.eea.europa.eu/es/senales/senales-2012/en-detalle/residuos-alimentarios> Para conocer el impacto en la generación de residuos de la industria alimentaria.

Web 4: <https://www.cogersa.es/metaspaces/portal/14498/50098>. Para conocer la gestión de residuos en una EDAR.

Web 5: <http://futurenviro.es/pdf/reportajes-especiales/13-FuturENVIRO-Marzo-2014-COGERSA-ASTURIAS.pdf>. Para conocer más del tratamiento de digestión anaerobia.

Web 6:
<http://fiab.es/es/archivos/documentos/INFORME ECONOMICO FIAB 2017.pdf>. Para conocer el impacto de la industria alimentaria.

Web 7: <https://www.eea.europa.eu/es/senales/senales-2012/en-detalle/residuos-alimentarios> Para conocer el impacto en la generación de residuos de la industria alimentaria.

Web 8: <https://www.boe.es/buscar/pdf/2002/BOE-A-2002-14187-consolidado.pdf>